EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores: P. Huber, Basel · R. Matthey, Lausanne · A. v. Muralt, Bern · L. Ruzicka, Zürich

Redactor: H. Mislin, Basel · Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL (SCHWEIZ)

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

Articles généraux – Übersichtsreferate
Articoli riassuntivi – Surveys

A. Wettstein: Biosynthèse des hormones stéroïdes 329

Brèves communications – Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni – Brief Reports

J. Willems: Abdrücke aus hochmolekularen Polyamiden von Kristallgitterflächen als Matrizen 344

C. De Marco and L. Tentori: Sulfur Exchange between Thiotaurine and Hypotaurine 345

J. A. Maclaren: 'Cystine Monosulfoxide' and Related Compounds 346

R. A. Heacock and B. D. Scott: Noradrenolutin 347

L. Michelazzi: Uncoupling of Oxidative Phosphorylation in Antigen-Antibody Reactions 348

Elsbeth Schätzle, H. Urheim, M. Rottenberg und M. Thürkauf: Nachbargruppeneffekt des Pyridinringes beschleunigt alkalische Ester-Hydrolyse 350

V. Erspamer and M. B. Nobili: Observations on the Fate of Oral 4-Hydroxy-tryptophan in Man 351

D. L. Woodhouse: Rat Serum Para-Phenylene Diamine Oxidase Reaction During Azo Dye Carcinogenesis 352

J. Mokrý, I. Kompriš, O. Bauerovà, J. Tomko und S. Bauer: Vincanorin und Vincarein, zwei neue Alkaloide aus *Vinca minor* L. 354

F. Šorm and J. Veselý: Potentiation of the Cancerostatic Effect of 6-Azauridine and 6-Azacytidine with 5-Bis-(2-chloroethyl)aminomethyluracil 355

J. Churý: Gonadotrope Wirkung von Spermaextrakten 355

Mary F. Argus, Charlotte J. Leutze, and Judith F. Kane: Nitrosamines and other Carcinogens as Agents of Protein Denaturation 357

H. Thölen, F. Bigler, and H. Staub: Pathogenesis of the Uremic Syndrome. Pharmacological Studies on Acetoin and 2,3-Butylene Glycol 359

W. Lee and J. H. Turnbull: An Ageing Effect in Inhibited Esterases: Elimination of Phenol from DPCIP-Inhibited Chymotrypsin and Trypsin 360

R. L. de C. H. Saunders, R. James, and D. C. d'Arcy: X-Ray Microscopy of Intestinal *Villi* 361

I. B. Riedel and J. Simpson: Absence of Salivary Invertase in Queen and Drone Honeybees 365

R. Weber: Similar Pattern of Fine Structure in Basement Lamella of the Skin and the External Sheat of the Notochord in *Xenopus* larvae 365

E. Berne, L. Hallberg, and S. E. Lindell: Beat to Beat Analysis of the Radiocardiogram 366

M. Lemppenau: Atypische Wundheilungsvorgänge in der Haut von Großschmetterlingsraupen 367

M. Lemppenau: Entwicklungsstörungen bei Großschmetterlingen nach verschiedenen Operationen, insbesondere nach Implantationen von Gewebe- und Papierstückchen in die Leibeshöhle der Raupen von *Antheraea pernyi* Guér. 369

Barbara Konieczna-Marczyńska: The Induction of Tolerance in Hamsters to Transplants of Mouse Sarcoma by Means of Heteroparabiosis 370

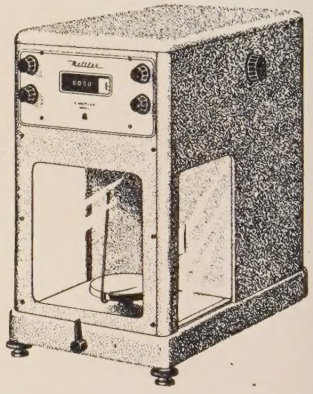
K. Küttner, H. Majer, G. Huber und R. Jaques: Untersuchungen an Ionenaustauschmodellen zum Verständnis der Physiologie biogener Amine. Austauschversuche an einem schwefelsäuregruppentragenden Harz zum Verständnis von sogenannten Histaminliberationsvorgängen 371

Anna C. Pai and Salome Gluecksohn-Waelsch: Interaction of *t* Alleles at the *T* Locus in the House Mouse (Studiorum Progressus) 372

G. E. Utzinger: The Discrimination of Various Cystine Sulfoxides (Studiorum Progressus) 374

E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich

Garantierte
Genauigkeit
Konstante
Empfindlichkeit
Bessere
Reproduzierbarkeit



A 2

Liste des annonceurs – Verzeichnis der Inserenten – Elenco degli inserzionisti – List of advertisers – Experientia XVII/8

Bios Laboratories, Inc., New York
CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Farmochimica Cutolo-Calosi S.p.A., Neapel
Ganz Optar AG, Zürich
J. R. Geigy AG, Basel
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel
Dr. Alfred Hüthig Verlag GmbH., Heidelberg
Lonza AG, Basel
E. Mettler, Zürich
Sandoz AG, Basel
Schwitter AG, Basel
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 74.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 74.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può essere richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 74.–. Il prezzo è inteso in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is sFr. 74.–. Price in Swiss currency.

Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1961 Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

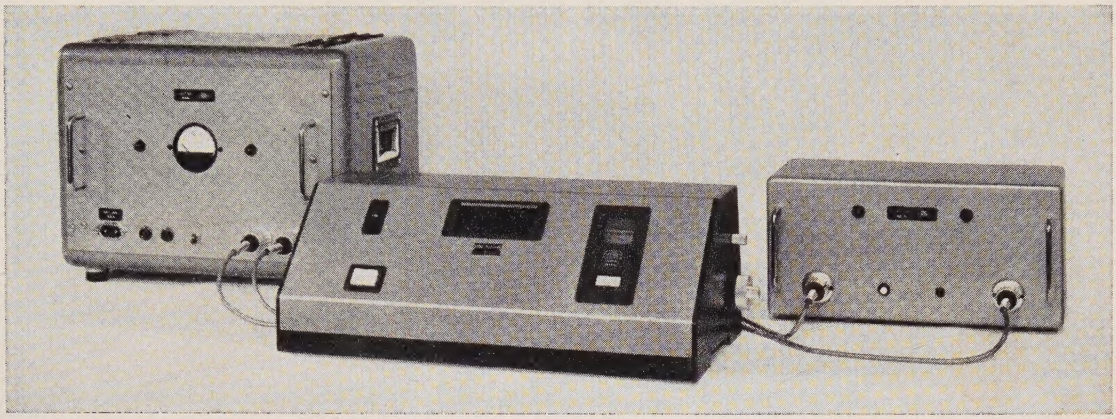
Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS

Lichtelektrisches Präzisionspolarimeter 0,005°

Besondere Merkmale:

- Hohe Meßgenauigkeit
- Frei von persönlichen Einstellfehlern und frei von Parallaxe
- Ermüdungsfreie Reihenmessung und denkbar einfache Bedienung
- Automatische Empfindlichkeitsregelung



Bitte verlangen Sie den Prospekt Nr. 50–381/E

Zuverlässige Beratung und Service durch eigenes Fachpersonal

CARL ZEISS

Generalvertretung für die Schweiz:

GANZ *Optar* AG
ZÜRICH
Bahnhofstr. 40 Tel. (051) 25 16 75

Lonza

Lösungsmittel
Methylacetat, Aethylacetat, Butylacetat, Lösungsmittelgemische, n-Butanol

Organische technische Produkte
Formaldehyd, Acetaldehyd, Paraldehyd, Crotonaldehyd, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Natriumacetat, Vinylacetat monomer, Anilinöl, Nitrobenzol, Dicyandiamid, Metaldehyd

Organische Zwischenprodukte
Acetessigäthylester, Acetessigmethylester, Phenylmethylpyrazolon, Acetessiganilid, Acetessig-o-chloranilid und andere Acetessigarylamide, Acetylaceton, Methyläthylpyridin, Nikotinsäure, Nikotinsäureamid, Acetonitril, Isobuttersäurenitril

Kunststoffe
Polyvinylchlorid in verschiedenen Qualitäten, Vinylchlorid/Vinylacetat-Mischpolymerisate, Polyvinylacetat-Dispersionen VIPOLIT®
Polymethylmethacrylat in Platten VOS®

Stickstoffprodukte
Ammoniak, Salpetersäure, Ammonnitrat, Natriumnitrat, Natriumnitrit, Ammonsulfat, Harnstoff

Stickstoff- und kombinierte Dünger
Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Kalkstickstoff, Ammonsulfat, Nitrophosphat, Nitrophosphatkali, Nitrophosphatkali borhaltig, Volldünger Lonza®, Rebendünger Lonza®, Tabakdünger Lonza®, Lonzin® für Topfpflanzen, Composto Lonza®

Calciumcarbid

Ferro-Legierungen
Ferrosilicium, Ferrosilicium-Aluminium (Alsimin®, Feralsit®), Ferrosilicium-Mangan-Aluminium (Simanal®)

Siliciummetall (Reinsilicium)

Siliciumcarbid für schleif- und feuerfeste Zwecke sowie Lonsicar® als Betonhartstoff

Graphit min. 99,9 % C

LONZA ELEKTRIZITÄTSWERKE + CHEMISCHE FABRIKEN
AKTIENGESELLSCHAFT BASEL

Jetzt erhältlich, 90-95% rein

Coenzym A

10 mg $ 7.30	250 mg $ 146.—
52 mg $ 16.—	500 mg $ 230.—
100 mg $ 60.—	

Weitere Biochemikalien höchster Reinheit:

Ubichinon-30 (Coenzym Q_6)

6-Thioctsäure (d,l-α-Liponsäure)

6,8-Dithiol-octancarbonsäure (reduzierte d,l-α-Liponsäure)

6-Thioctsäureamid (d,l-α-Liponsäure-amid)

6,8-Dithiol-octancarbonsäureamid (reduziertes d,l-α-Liponsäure-amid)

6-Thioctsäureglycinamid, Natriumsalz

Diphosphopyridin Nucleotid (DPN)

Thiamin Monophosphat

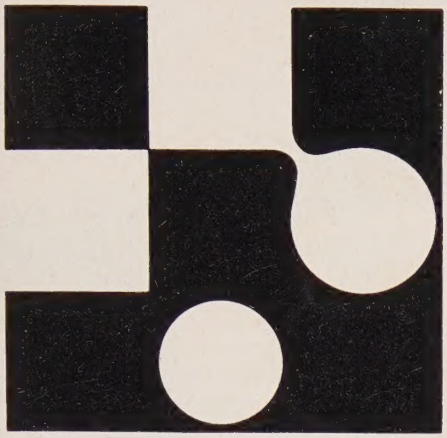
Thiamin Pyrophosphat (Cocarboxylase)

Pyridoxal-5′-phosphat (Codecarboxylase)

Industrielle Mengen sind auch lieferbar

Biochemische Abteilung
FARMOCHIMICA
CUTOLO
CALOSI S. p. A.

Postfach 332 Neapel (Italien)



Clichés
Schwitter AG
Basel - Zürich
Bureau Lausanne

UNSERE ARBEITSGEBIETE

Clichés für
Ein- und Mehrfarbendrucke
Dow-Magnesium Clichés
Offset-Photolithos
Farbenphotographie
für Kunst und Industrie
Albert-Fischer-Galvanos
Kunststoff-Duplikate
Gummi-Duplikate
Matern, Stereos
Prägeclichés für alle Zwecke
Amerikanische Retouchen
Photo-Vergrösserungen
Industriephotographie

WE NEVER
SAY "NO"

WE SHIP YOUR
ORDER TODAY
(Air Mail or Parcel Post, as you wish)

18,000

CHEMICALS FOR
IMMEDIATE DELIVERY
FROM STOCK.
LARGEST VARIETY
ANYWHERE

Ask for our new catalogue

BIOS *Laboratories, Inc.*
17 West 60th St., New York City 23, U.S.A.
Kabeladresse: BIOSLAB

EXPERIENTIA
Sammelmappe

Diese Mappe hat den Zweck, die Hefte des laufenden Jahrganges zusammenzuhalten, bevor der komplette Jahrgang gebunden werden kann. Die einzelnen Hefte können mittels einer neuartigen patentierten Haltevorrichtung in die Mappe eingeheftet und im Bedarfsfall wieder herausgelöst werden. Mit dieser geschmackvoll in Kunstleder gebundenen Mappe soll dem Übelstand abgeholfen werden, dass einzelne Hefte im Laufe des Jahres verlorengehen und vor dem Einbinden nachbezogen werden müssen. Die Sammelmappe ist so massiv konstruiert, daß sie ihren Dienst auf Jahre hinaus leisten wird.

Preis in Kunstleder gebunden: Fr. 6.75

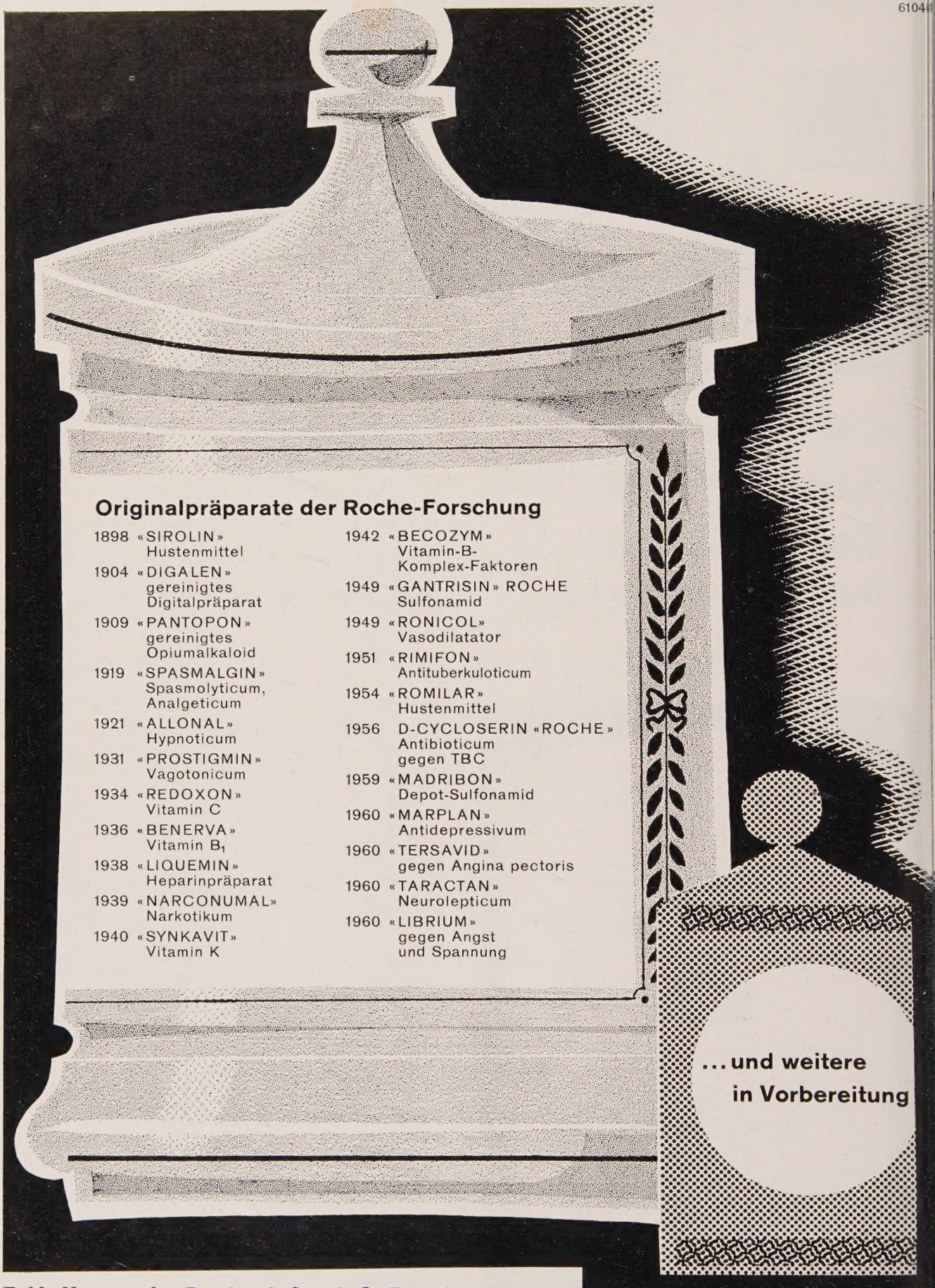
BESTELLSCHEIN

An den Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz)
Ich bestelle... Sammelmappe(n) zum Preise von Fr. 6.75

Name: Vorname:

Ort: Strasse:

Bitte in Blockschrift schreiben



Originalpräparate der Roche-Forschung

1898 «SIROLIN»
Hustenmittel

1904 «DIGALEN»
gereinigtes
Digitalpräparat

1909 «PANTOPON»
gereinigtes
Opiumalkaloid

1919 «SPASMALGIN»
Spasmolyticum,
Analgeticum

1921 «ALLONAL»
Hypnoticum

1931 «PROSTIGMIN»
Vagotonicum

1934 «REDOXON»
Vitamin C

1936 «BENERVA»
Vitamin B_1

1938 «LIQUEMIN»
Heparinpräparat

1939 «NARCONUMAL»
Narkotikum

1940 «SYNKAVIT»
Vitamin K

1942 «BECOZYM»
Vitamin-B-
Komplex-Faktoren

1949 «GANTRISIN» ROCHE
Sulfonamid

1949 «RONICOL»
Vasodilatator

1951 «RIMIFON»
Antituberkuloticum

1954 «ROMILAR»
Hustenmittel

1956 D-CYCLOSERIN «ROCHE»
Antibioticum
gegen TBC

1959 «MADRIBON»
Depot-Sulfonamid

1960 «MARPLAN»
Antidepressivum

1960 «TERSAVID»
gegen Angina pectoris

1960 «TARACTAN»
Neurolepticum

1960 «LIBRIUM»
gegen Angst
und Spannung

**...und weitere
in Vorbereitung**

F. Hoffmann-La Roche & Co. A. G. Basel

EXPERIENTIA

Vol. XVII – Fasc. 8 Pag. 329–376 15. VIII. 1961

Biosynthèse des hormones stéroïdes[1,2]

Par A. WETTSTEIN[3]

Quantité de problèmes se posent au biochimiste discutant des hormones stéroïdes. Le plus intéressant, celui qui touche la question du mécanisme d'action des hormones, n'est pas encore élucidé. Au sujet des réactions primaires des hormones stéroïdes avec les récepteurs spécifiques de la cellule au point d'action, nous ne savons presque rien. On parle de changements de perméabilité des zones frontières, soit au niveau de la membrane cellulaire, soit au niveau des particules intracellulaires. Sur un autre terrain d'approche on recherche l'influence activatrice ou inhibitrice des hormones stéroïdes sur des systèmes enzymatiques. Que ces hormones puissent être parties intégrantes de systèmes enzymatiques, comme c'est le cas pour beaucoup de vitamines, doit être exclu en général.

Le présent rapport concerne l'aspect biochimique des hormones stéroïdes que je considère comme le deuxième en importance; c'est leur biosynthèse. Dans ce domaine particulier du métabolisme il existe une immense documentation bien fondée, ce qui m'oblige à restreindre mon exposé. La question de savoir ce que l'organisme produit en fait de métabolites ne peut pas être abordée, puisqu'à ce jour on a, par exemple, isolé des glandes surrénales seules environ 70 stéroïdes. Même si nous nous bornons aux substances dont la sécrétion par les glandes endocrines est démontrée par le fait qu'elles se trouvent en plus grande quantité dans leur sang veineux que dans leur sang artériel, il en reste encore une vingtaine[4]. Nous allons donc examiner principalement le cheminement des réactions qui conduisent aux hormones stéroïdes, en laissant de côté les transformations cataboliques. Enfin nous aborderons le sujet de la régulation de la biosynthèse, ainsi que celui des substances qui freinent ou bloquent la biosynthèse[5] et qui sont d'un grand intérêt pratique. Nous ne pouvons citer que les publications les plus récentes; pour d'autres travaux plus anciens et souvent de base, nous nous en référons aux mises au point citées.

Le *schéma principal de la biosynthèse* de toutes les hormones stéroïdes suit au début celui du cholestérol (C_{27}) à partir d'acide acétique. Le cholestérol est lui même transformé en pregnénolone (C_{21}) par séparation d'aldéhyde iso-caproïque (C_6) de la chaîne latérale. Par déshydrogénation de la pregnénolone se forme déjà l'hormone progestative: la progestérone. Ces dérivés du prégnane sont à leur tour les substances centrales de départ, d'une part pour l'élaboration des hormones androgènes (C_{19}) et œstrogènes (C_{18}), d'autre part pour l'élaboration de produits types, oxygénés plus fortement: les hormones corticosurrénales glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes. Le cholestérol et la pregnénolone[6] représentent ainsi des précurseurs de toutes les hormones stéroïdes, mais qu'ils soient des intermédiaires obligatoires n'est pas du tout prouvé. De toute façon nous devons nous occuper d'abord de leur biogénèse.

Cholestérol. Le cholestérol est synthétisé principalement dans le foie, dans l'intestin et dans la peau, mais d'autre part aussi, par exemple, et ceci nous intéresse spécialement, dans les glandes surrénales et dans les gonades. Les étapes de la synthèse ont été reconnues très largement grâce à des travaux avec des enzymes du foie et particulièrement grâce aux recherches de RITTENBERG et SCHÖNHEIMER, de BLOCH, BUCHER, COOK, de CORNFORTH et POPJÁK, DAUBEN, FOLKERS, LYNEN, RUZICKA, TAVORMINA et al., ainsi que de WOODWARD (résumés voir [7–9]). Cette biosynthèse

[1] D'après une conférence faite aux VIes Journées biochimiques latines, Genève (Suisse), 25 mai 1961.

[2] Publication No. 179 *Über Steroide*. Communication No. 178 voir K. HEUSLER, P. WIELAND et A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta, sous presse.

[3] Laboratoires de Recherche, CIBA S.A. Bâle, Département Pharmaceutique. Je remercie Monsieur CH. MEYSTRE qui s'est chargé de la traduction française.

[4] L. T. SAMUELS, dans D. M. GREENBERG *Metabolic Pathways* (Academic Press, New York 1960), vol. 1, p. 431.

[5] R. GAUNT, J. J. CHART et A. A. RENZI, Science *133*, 613 (1961).

[6] On vient dernièrement de déceler de la pregnénolone dans les racines d'une Asclépiadacée (*Xysmalobium undulatum*); ainsi une corrélation intéressante entre la biosynthèse qui conduit d'une part dans le règne végétal aux glucosides digitaliques et d'autre part dans le règne animal aux hormones stéroïdes est mise en évidence (R. TSCHESCHE, Angew. Chemie *73*, 74 (1961)). D'ailleurs depuis longtemps déjà on utilise largement des génines stéroïdes végétales pour la fabrication industrielle de la pregnénolone.

[7] T. T. TCHEN, dans [4], p. 389. – G. POPJÁK et J. W. CORNFORTH, Adv. Enzymol. *22*, 281 (1960). – Divers auteurs dans *Biosynthesis of Terpenes and Sterols* (CIBA Found. Symp., Churchill, London 1959). – K. BLOCH; G. POPJÁK, dans G. PINCUS, *Hormones and Atherosclerosis* (Academic Press, New York 1959), p. 1; 7. – D. KRITCHEVSKY, dans *Cholesterol* (Wiley & Sons, New York 1958), p. 54.

[8] R. G. GOULD, dans R. P. COOK *Cholesterol* (Academic Press, New York 1958), p. 209.

[9] (a) L. F. FIESER et M. FIESER, *Steroids* (Reinhold Publ. Corp., New York 1959), p. 403. – (b) E. HEFTMANN et E. MOSETTIG, *Biochemistry of Steroids* (Reinhold Publ. Corp., New York 1960), p. 3.

(Figure 1) comprend à partir de l'acide acétique environ 30 réactions enzymatiques. Elle diffère dès le début de celle des acides gras supérieurs par le fait qu'il se forme ici tout d'abord de l'acéto-acétyl-CoA (II) tandis que pour les acides gras il s'agit, d'après les plus récentes données de LYNEN, du malonyl-CoA. Avec une troisième molécule d'acétyl-CoA prend naissance, sous l'influence de l'enzyme microsomique, le β-hydroxy-β-méthyl-glutaryl-CoA (III). Celui-ci donne par réduction de la fonction thioester-carboxylique, en passant par le stade aldéhyde, le carbinol primaire sous forme de sa δ-lactone, l'acide *mévalonique* (IV). Ce dernier avait déjà été isolé antérieurement comme substance de croissance du *Lactobacillus casei*.

Contrairement aux premières suppositions la condensation de l'acide mévalonique ne passe pas par l'isoprène, qui en fait ne peut servir de précurseur biologique. La condensation se fait au contraire avec le pyrophosphate du Δ^3-isopenténol (V), qui dérive lui-même du 5-pyrophosphate de l'acide mévalonique et peut être désigné comme «l'unité isoprène biologique» cherchée depuis longtemps. Trois de ces unités se condensent ensuite par isomérisation en *pyrophosphate de farnésol* (VI). Deux molécules de ce dérivé des sesquiterpènes se lient par réduction en *squalène* (VII), qui avait été déterminé comme produit intermédiaire de cette synthèse en 1953 déjà. Jusqu'à ce dernier stade aliphatique (avec 30 atomes de C) toute la série de réactions est anaérobie, c'est-à-dire qu'elle se poursuit par réduction et de façon formelle par élimination d'eau et de CO_2.

De toutes les possibilités de pliage du squalène, celle proposée par WOODWARD et BLOCH est indiquée dans la Figure 1. Des expériences avec des indicateurs radioactifs ont en effet montré que chez l'homme et l'animal *in vivo* ainsi qu'avec des homogénats de foie, TPNH, etc., *in vitro* c'est bien dans cet arrangement qu'il est cyclisé oxydativement. Ainsi se forme, d'après RUZICKA en une réaction «concertée» ou «non stop», avec déplacement des deux groupes méthyles dans une position voisine et introduction d'un groupe hydroxyle, le *lanostérol* (VIII) tétracyclique. Dans cette stérine, dont la vie dans le foie est très courte, 3 groupes méthyles angulaires sont éliminés sous l'influence d'oxygène et de TPNH, tout d'abord celui de la position 14, la configuration restant conservée ainsi que, de manière étonnante, la position de la double liaison du squelette; suivent alors les deux groupes méthyles en C-4 pour former la stérine de la levure: le *zymostérol*[10] (IX).

La transformation du zymostérol en cholestérol (XII), qui demande également de l'oxygène, n'est pas encore connue de façon exacte. Les produits intermédiaires comprennent probablement des combinaisons Δ^7-6-hydroxylées du type X qui peuvent expliquer le passage

[10] Pour le chemin par le méthosténol, voir W. W. WELLS et C. L. LORAH, J. biol. Chem. *235*, 978 (1960).

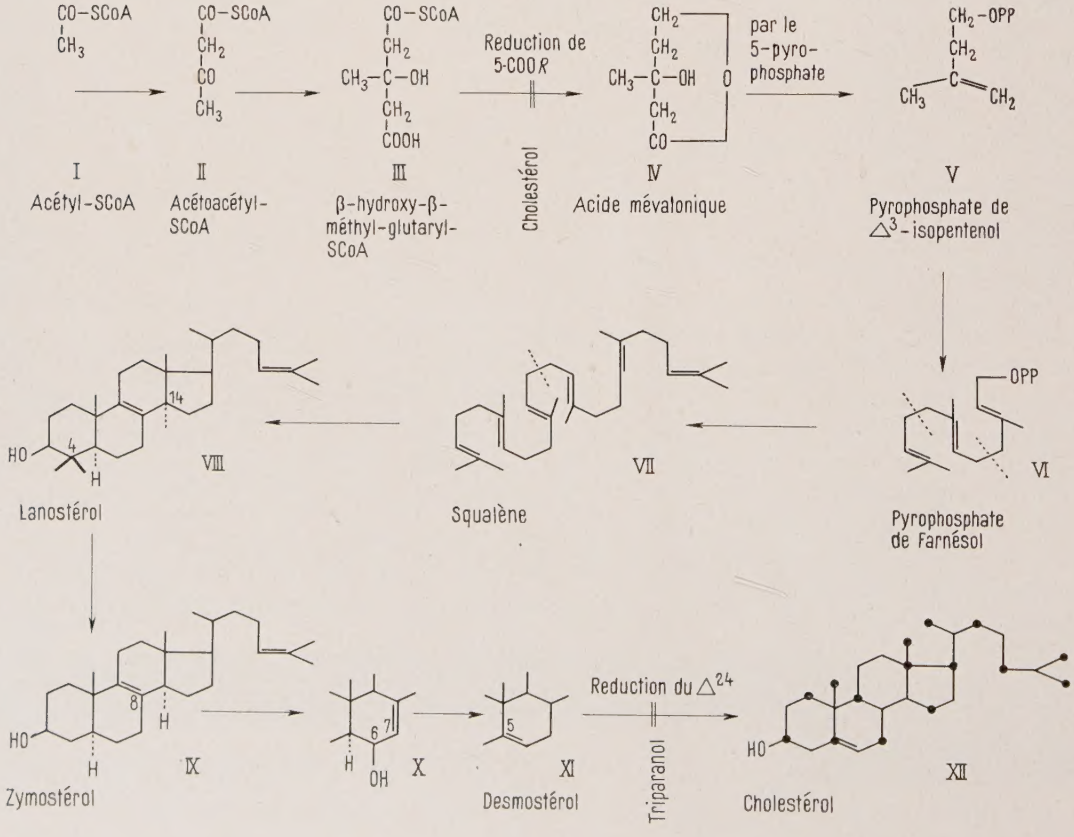


Fig. 1. Biosynthèse du cholestérol.

de la double liaison de la position 8, 9 à 5, 6. Vraisemblablement, la réduction de la double liaison de la chaîne latérale ne s'effectue qu'à la fin, de telle sorte que le *desmostérol* (XI) serait le dernier produit intermédiaire. Dans la formule XII les atomes de carbone du cholestérol provenant des groupes méthyles des restes acide acétique sont désignés spécialement. Les essais avec des précurseurs marqués radioactifs ont été de toute importance pour la détermination de ces emplacements et, par conséquent, de toute la biosynthèse. Il est cependant probable que, à côté de la synthèse principale indiquée ici, d'autres chemins conduisent de l'acide acétique au cholestérol.

La *régulation* du taux de cholestérol du sang qui, normalement, est relativement constant se fait par un mécanisme homéostasique, un mécanisme «feed back». On voit par exemple qu'après ingestion de cholestérol, sa biosynthèse est réduite de manière frappante et ceci au stade de la transformation réductive de l'hydroxyméthyl-glutaryl-CoA (III) en acide mévalonique (IV)[11]. De ce fait il est presque impossible de créer une hypercholestérinémie chez l'homme et il n'est pas certain que l'hypercholestérinémie soit d'importance primaire pour l'apparition de l'artériosclérose. D'autre part il est possible de produire de l'athéromatose et de l'athérosclérose chez l'animal par hypercholestérinémie expérimentale, et des lésions de ce type contiennent également beaucoup de cholestérol chez l'homme. Le cholestérol est en effet synthétisé aussi localement par les tissus de l'aorte à partir d'acide acétique.

De toute façon des substances qui freineraient ou bloqueraient la biosynthèse du cholestérol présentent un grand intérêt. En effet nombre de produits sont connus[12], qui semblent posséder cette action *in vitro*, mais très rarement *in vivo*; ainsi particulièrement certains analogues de l'œstrane, mais aussi de l'androstane, de l'acide mévalonique et du farnésol, ainsi que la cholesténone, en outre des substances qui n'ont aucune parenté chimique avec le cholestérol ou ses précurseurs, telles que des acides gras inférieurs phénylés, l'amide de l'acide nicotinique ou l'acide pyridylacétique et, pour finir, même des substances inorganiques comme des sels de vanadium. Actuellement l'étude du Triparanol (Mer-29) qui s'apparente chimiquement aux œstrogènes synthétiques est poussée activement; cette substance bloque la biosynthèse du cholestérol spécifiquement au dernier stade de l'hydrogénation du desmostérol (XI)[13] dont le taux augmente. On ignore encore si le desmostérol possède lui aussi des propriétés athérogènes.

Avant de nous pencher sur la biosynthèse des groupes particuliers d'hormones stéroïdes à partir du cholestérol, il est nécessaire de toucher rapidement la question suivante: le cholestérol est-il un stade intermédiaire obligatoire, ou existe-t-il des *voies vicariantes* de la biogénèse? La coexistence de synthèses indépendantes du cholestérol a été suggérée pratiquement pour toutes les hormones stéroïdes. Des indications ont été fournies par des expériences dans lesquelles l'acide acétique ou d'autres précurseurs inférieurs radioactifs furent transformés en hormones stéroïdes possédant une activité spécifique supérieure à celle du cholestérol isolé en même temps. HECHTER a été un des premiers à obtenir de tels résultats et il considère l'existence de voies vicariantes comme probable, puisqu'il dit: «La nature semble ne pas vouloir s'appuyer sur une seule voie de synthèse pour des fonctions vitales si importantes.» D'autre part c'est HECHTER qui a discuté d'une façon critique les résultats cités[14]. Il dénie la valeur de preuve concluante à ces essais, même à ceux exécutés avec des homogénats exempts de cellules, tant que la comparaison des activités spécifiques n'a pas été faite sur une base cinétique et parce qu'il existe probablement plusieurs «pools» métaboliques du cholestérol qui ne sont pas tous capables d'effectuer la synthèse hormonale. Puisque les substances intermédiaires «X», par lesquelles le cholestérol serait évité, n'ont pas encore été définies jusqu'ici, nous les laissons de côté dans les schémas suivants.

Hormones progestatives. La dégradation de la chaîne latérale du cholestérol (XII)[14] dans les surrénales, les testicules, les ovaires et le placenta, conduit, ainsi que le montre la Figure 2 aux hormones progestatives. Avec des enzymes hydroxylants se forme tout d'abord le 20β-hydroxy-cholestérol (XIII) et peut-être à partir de celui-ci un 20β,22ξ-dihydroxy cholestérol XIV, puis ensuite sous l'influence d'une 20,22-desmolase la *pregnénolone* (XV). Dans cette transformation étudiée spécialement sur des mitochondries de la surrénale et qui nécessite du TPNH et de l'oxygène, il se scinde contrairement aux constatations antérieures non pas de l'acide iso-caproïque mais de l'aldéhyde iso-caproïque[15]. C'est aussi tout récemment que nous avons réussi pour la première fois à isoler de la pregnénolone à partir de surrénales (de porc)[16] tandis qu'elle avait été isolée depuis longtemps déjà des tissus testiculaires.

C'est ce passage du cholestérol hydroxylé à la pregnénolone qui de toutes les étapes de la biogénèse de toutes les hormones stéroïdes dépend le plus fortement de l'*hormone adrénocorticotrope* (ACTH). Si à ce stade la concentration en triphosphopyridine-nucléotide (TPNH) est déterminante pour la vitesse de réaction,

[11] F. LYNEN et al., Biochem. Z. *330*, 269 (1958); Fed. Proc. *18*, 20 (1959). – M. D. SIPERSTEIN et M. J. GUEST, J. clin. Invest. *39*, 642 (1960).

[12] R. G. GOULD et R. P. COOK, dans [8], p. 276. – I. H. PAGE, dans [8], p. 431. – T.-M. LIU et K. K. CHEN, dans E. JUCKER, *Fortschritte der Arzneimittelforschung* (1959), vol. 1, p. 127.

[13] T. R. BLOHM et al., Arch. Biochem. Biophys. *85*, 245, 250 (1959). – W. M. STOKES et W. A. FISH, J. biol. Chem. *235*, 2604 (1960). – J. AVIGAN, E. MOSETTIG et al., J. biol. Chem. *235*, 3123 (1960).

[14] O. HECHTER, dans [8], p. 337.

[15] G. CONSTANTOPOULOS et T. T. TCHEN, Abstracts Papers 139th Meet. Amer. Chem. Soc. (1961), p. 31C; J. biol. Chem. *236*, 65 (1961).

[16] R. NEHER et A. WETTSTEIN, Acta endocr. *35*, 1 (1960).

alors, d'après HAYNES[17], qui suppose une production de ce cofacteur sous l'influence de l'ACTH, l'effet de cette hormone serait explicable. Mais des interprétations différentes sont aussi possibles (voir[18]). De toute façon l'ACTH a une influence primordiale sur cette étape et de ce fait sur la biosynthèse des glucocorticoïdes, qui eux-mêmes règlent la production d'ACTH par un mécanisme «feed-back»; il n'est donc pas étonnant que la synthèse de cette hormone polypeptidique linéaire contenant 39 acides aminés soit poussée activement par des groupes de chercheurs américains et suisses (Figure 3). L'étude de ces travaux sort du cadre de cet exposé. Il suffit d'indiquer que la séquence 1–24 (sur les lignes a et b), obtenue dans la dégradation de l'ACTH, suffit pratiquement pour l'action corticotrope. Déjà l'année dernière la séquence 1–19 (c'est-à-dire la ligne a) a été synthétisée par SCHWYZER ainsi que LI et a montré environ 30% de l'activité totale[19]; ensuite HOFMANN a réussi la synthèse de la séquence 1–23, qui montre déjà l'activité intégrale[20]. Ce n'est que ces derniers jours que KAPPELER et SCHWYZER[21] de nos laboratoires ont rapporté la synthèse de la séquence 1–24 possédant l'activité totale; ils ont ainsi fait le pont entre les voies synthétiques et l'hydrolyse, qui d'ailleurs n'avait jamais fourni de produit pur. Dans le cadre de notre discussion il est intéressant de

[17] R. C. HAYNES et L. BERTHET, J. biol. Chem. *225*, 115 (1957).
[18] N. SABA, dans *Biosynthesis and Secretion of Adrenocortical Steroids* (University Press, Cambridge 1960), p. 96.
[19] R. SCHWYZER et al., Angew. Chem. *72*, 915 (1960). – C. H. LI et al., J. Amer. chem. Soc. *82*, 5760 (1960).
[20] K. HOFMANN et al., J. Amer. chem. Soc. *83*, 487 (1961).
[21] H. KAPPELER et R. SCHWYZER, Conférence à Bruges, le 5 mai 1961; Helv. chim. Acta *44*, 1136 (1961).

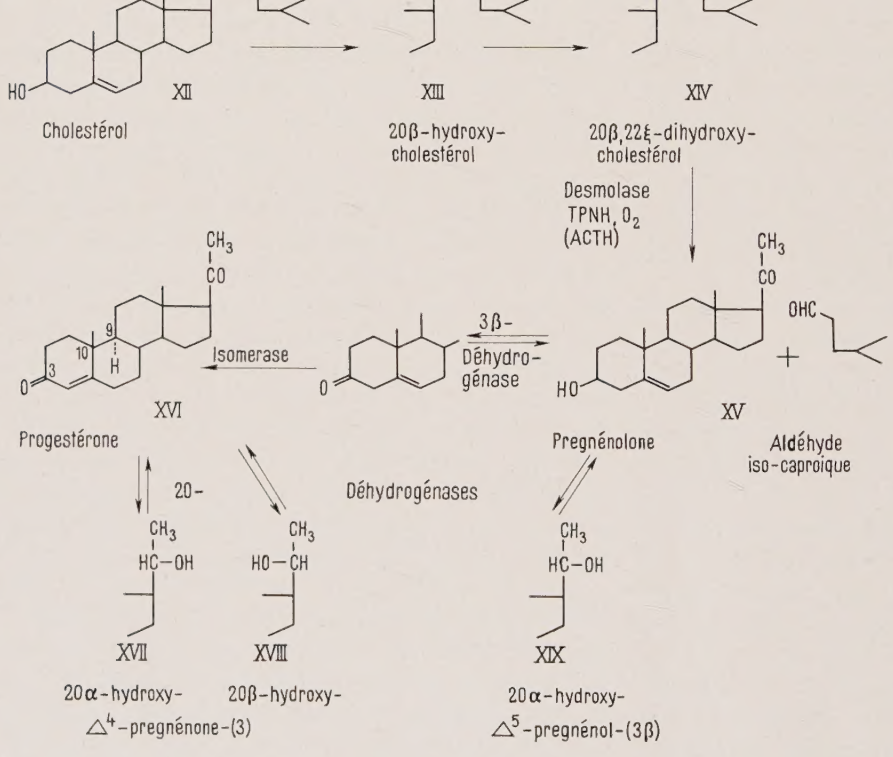


Fig. 2. Biosynthèse des hormones progestatives.

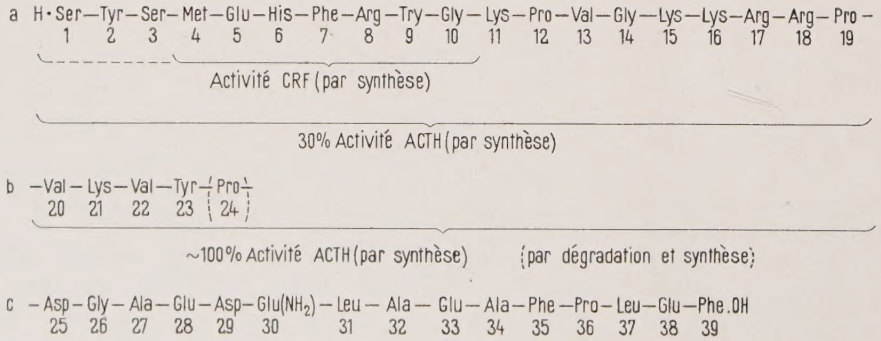

a H·Ser–Tyr–Ser–Met–Glu–His–Phe–Arg–Try–Gly–Lys–Pro–Val–Gly–Lys–Lys–Arg–Arg–Pro–
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
Activité CRF (par synthèse)
30% Activité ACTH (par synthèse)
b –Val–Lys–Val–Tyr–Pro–
20 21 22 23 24
~100% Activité ACTH (par synthèse) (par dégradation et synthèse)
c –Asp–Gly–Ala–Glu–Asp–Glu(NH_2)–Leu–Ala–Glu–Ala–Phe–Pro–Leu–Glu–Phe.OH
25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

Fig. 3. β-corticotropine de l'hypophyse de porc.

noter encore que des séquences beaucoup plus courtes telles que 1–10 et même 4–10 sont capables, *in vitro*, de libérer de l'ACTH de l'hypophyse[22]; elles possèdent donc une certaine activité du *corticotropin releasing factor* (CRF), hormone de l'hypothalamus postulé par Guillemin, deGarilhe, Sayers et par d'autres auteurs[23,24], et règlent ainsi indirectement la biogénèse des stéroïdes.

Le premier pas de la transformation de la pregnénolone (XV) en progestérone[4], consiste en la déshydrogénation réversible du groupe carbinol en cétone (Figure 2), sous l'influence d'une déhydrogénase des 3β-hydroxy stéroïdes[25] trouvée dans les microsomes, de préférence avec DPN comme cofacteur. L'enzyme est stéréospécifique, de telle sorte qu'elle attaque bien des combinaisons sans double liaison dans les cycles A et B, mais pas de groupes hydroxyles 3α. Suit alors, sous l'action d'une Δ^5-3-céto isomérase, contenue dans le cytoplasme, le déplacement irréversible de la double liaison dans la position conjuguée par rapport au groupe cétonique avec formation de la *progestérone* (XVI). Des enzymes analogues, une 3β-déhydrogénase et une isomérase, induites dans certaines bactéries, ont été obtenus par Talalay, le deuxième enzyme étant même isolé sous forme cristalline[26].

La progestérone est indubitablement l'hormone progestative propre. Elle a été isolée du corps jaune, il y a 27 ans déjà, par 4 groupes de chercheurs dont le nôtre, plus tard des glandes surrénales, mais ce n'est que dernièrement que nous avons pu démontrer sa présence dans les tissus testiculaires[27]. Elle a d'autre part aussi été trouvée dans des homogénats ou des perfusats de corps jaunes, de placenta, de surrénales et de testicules. La preuve irréfutable de la sécrétion de la progestérone a été fournie par la méthode citée au début, par sa concentration comparativement forte dans le sang veineux des ovaires[28] (variable suivant le cycle), du placenta[29] et des surrénales[30].

L'organisme produit également *d'autres substances progestatives* qui cependant, vu leurs faibles quantités et leurs faibles activités spécifiques sont d'importance physiologique moindre: Ainsi par exemple la cortexone, hormone des surrénales, pour laquelle un passage à la progestérone a été démontré dans des homogénats de rein, enfin les deux 20-dihydro progestérones XVII et XVIII découvertes par Zander. Ces deux substances ont été obtenues par exemple à partir du sang périphérique, de follicules mûrs, de corps jaunes, de tissu adipeux et du sang veineux de placenta[29,31]; la substance XVII de même à partir du sang veineux de surrénales[32] et récemment par nous à partir de tissu surrénalien[33]. Elles doivent être considérées comme des métabolites, puisqu'elles sont pratiquement inactives dans le test de Clauberg, mais montrent des activités respectives de 0,4 et 2,0 fois celle de la progestérone dans le test local de Hooker-Forbes. Un grand nombre de tels métabolites, 20α- ou 20β-hydroxylés, provenant des hormones de structure pregnénique ou de leurs précurseurs a été isolé[33], la combinaison XIX, par exemple, à partir de l'urine. Des déhydrogénases des 20-hydroxystéroïdes, qui utilisent de préférence TPN ou TPNH comme cofacteurs pour la transformation réversible, ont été identifiées dans beaucoup de tissus[33,34]. On a également trouvé dans des microorganismes des enzymes correspondants, dont certains sont cristallisables[35]; ils peuvent servir au dosage enzymatique quantitatif des 20-céto stéroïdes.

A cause de leur grand intérêt théorique nous citerons ici exceptionellement deux nouveaux *progestagènes synthétiques:* l'allyl œstrénol[36], un 19-nor stéroïde qui ne porte plus d'oxygène en C-3, et la 9β,10α-rétro-progestérone[37], qui diffère par ces deux centres d'isomérie de la progestérone. La rétro-progestérone est remarquablement plus active que l'hormone naturelle, spécialement sous forme de son dérivé 6-déhydro ou 6-déhydro 17α-acétoxylé.

Hormones androgènes. La Figure 4 montre les chemins de la biosynthèse qui conduisent aux hormones androgènes. L'hormone la plus abondante dans les testicules et qui en outre représente l'androgène naturel le plus actif chez l'homme est la testostérone (XXIV), suivie par l'androstènedione (XXIII)[27]. Ces deux substances ont été isolées, il y a longtemps déjà, en plus forte concentration du sang veineux testiculaire que du sang artériel[4]. Par contre, s'il a souvent été possible d'isoler de l'androstènedione (ainsi que son dérivé 11β-hydroxylé XXVIII et l'androsténolone = déhydro-épi-androstérone XXII) du sang veineux des surrénales, la testostérone ne l'a été que très rarement. La formation de la testostérone

[22] H. Kappeler et R. Schwyzer, Exper. *16*, 415 (1960); Helv. chim. Acta *43*, 1453 (1960).
[23] M. Vogt, dans [18], p. 85.
[24] G. Sayers, Adv. Abstr. Symposium Lectures, 1st Internat. Congr. Endocrinol. Copenhagen (1960), p. 25.
[25] B. Hurlock et P. Talalay, J. biol. Chem. *233*, 886 (1958); P. Talalay et H. G. Williams-Ashman, dans [24], p. 161; Rec. Progr. Hormone Res. *16*, 1 (1960).
[26] P. Talalay et H. R. Levy, CIBA Found. Study Group No. 2, 53 (1959). – F. S. Kawahara et P. Talalay, J. biol. Chem. *235*, PC 1 (1960).
[27] R. Neher et A. Wettstein, Helv. chim. Acta *43*, 1628 (1960).
[28] D. G. Edgar et al., Nature *170*, 543 (1952); J. Endocrinol. *16*, 378 (1957).
[29] J. Zander, T. R. Forbes, A. M. von Münstermann et R. Neher, J. clin. Endocrinol. Metab. *18*, 337 (1958).
[30] W. E. Balfour et al., Nature *180*, 1480 (1957). – R. V. Short, dans [18], p. 80.
[31] R. V. Short, CIBA Found. Colloq. Endocrinol. *11*, 362 (1957); J. Endocrinol. *16*, 415 (1958).
[32] W. E. Balfour et al., Nature *183*, 467 (1959). – Voir par contre: R. V. Short, dans [18], p. 74.
[33] R. Neher et A. Wettstein, Helv. chim. Acta *43*, 1171 (1960).
[34] W. G. Wiest, Adv. Abstr. Short Commun. 1st Internat. Congr. Endocrinol. Copenhagen (1960), 965.
[35] H. J. Hübener et al., Naturwiss. *46*, 112 (1959); Biochem. Z. *333*, 88, 95 (1960); Angew. Chemie *73*, 44 (1961). – A. L. Nussbaum et al., Chem. & Ind. *1960*, 836. – F. Carvajal et al., J. org. Chem. *24*, 695 (1959).
[36] S. A. Szpilfogel et al., Chem. & Ind. *1959*, 905.
[37] E. H. Reerink et al., Nature *186*, 168 (1960). – H. G. L. Schöler et al., dans [34], p. 917; Acta Endocrinol. *35*, 188 (1960).

semble impossible dans les surrénales normales, mais bien dans les tumeurs surrénaliennes. Tandis que la conversion de la pregnénolone (XV) en androstènedione se poursuit aussi bien dans les gonades que dans les surrénales, le passage de l'androstènedione à la testostérone dans les tissus endocriniens est, par contre, caractéristique des testicules et des ovaires. Inversement, les dérivés XXVIII et XXIX de l'androstènedione, oxygénés en position 11, sont des produits spécifiques du métabolisme des surrénales mais ne montrent qu'une très faible activité androgène.

Le fait que le passage de la pregnénolone à l'androstènedione dans les gonades et dans les surrénales (et probablement aussi dans le placenta) suit deux chemins différents résulte particulièrement des travaux de DORFMAN[38–40], ainsi que de NEHER et WETTSTEIN[16,27,41,42]. Dans les gonades, et ceci dans les testicules aussi bien que dans les ovaires, c'est le chemin passant par la progestérone et la 17α-hydroxy-progestérone (XXI) qui prime, dans les surrénales par contre le passage par la 17α-hydroxy-pregnénolone (XX) et l'androsténolone. Notons en marge que pour les surrénales une autre voie de synthèse indépendante des stéroïdes C_{21} et passant directement du cholestérol à l'androsténolone a été indiquée[43,44], mais ceci ne semble pas se confirmer[4].

Passons aux résultats des travaux récents concernant les différents chemins de synthèse: La première réaction consiste en une *17α-hydroxylation* de la pregnénolone ou de la progestérone; elle est donc identique à la première étape de la biosynthèse des glucocorticoïdes. Que l'incubation de coupes de testicules ou d'ovaires ou des homogénats produise de la *17α-hydroxy-progestérone* (XXI) à partir de la progestérone, puis ensuite de l'androstènedione et de la testostérone, à été démontré, il y a 5 ans déjà et en utilisant des éléments radioactifs, par différents groupes de chercheurs (SAMUELS; LYNN; DORFMAN; LIEBERMAN[4,38]). Il a aussi été possible, plus tard, de démontrer cette 17α-hydroxylation par des fractions de placenta humain[45] et par des préparations de surrénales de porc *in vitro*[46], enfin pour l'homme *in vivo*[47]. En accord avec ces faits la 17α-hydroxy-progestérone a été isolée des testicules par nous-mêmes[27], des ovaires par ZANDER[48] et il y a 20 ans déjà par PFIFFNER de même que par REICHSTEIN des surrénales. On a pu l'isoler également du sang veineux surrénalien humain[49,50]. La 17α-hydroxy-progestérone, un androgène très faible, est de même pratiquement inactive dans le test progestatif de

[38] R. I. DORFMAN, Proc. Fourth Internat. Congr. Biochem. Vienna *4*, 175 (1959).
[39] M. GOLDSTEIN, M. GUT et R. I. DORFMAN, Biochim. biophys. Acta *38*, 190 (1960).
[40] R. I. DORFMAN, dans [24], p. 211.
[41] F. W. KAHNT, R. NEHER, K. SCHMID et A. WETTSTEIN, Exper. *17*, 19 (1961).
[42] R. NEHER et A. WETTSTEIN, dans [34], p. 693.
[43] R. I. DORFMAN, CIBA Found. Colloq. Endocrin. *12*, 62 (1958).
[44] O. HECHTER, dans [8], p. 309.
[45] B. LITTLE et A. SHAW, dans [34], p. 713.
[46] B.G.RAO et R.D.H.HEARD, Arch. Biochem. Biophys. *66*, 504 (1957).
[47] S. SOLOMON, S. LIEBERMAN et al., J. biol. Chem. *233*, 1084 (1958).
[48] J. ZANDER, J. biol. Chem. *232*, 117 (1958).
[49] M. E. LOMBARDO et al., Endocrinol. *65*, 426 (1959).
[50] R. V. SHORT, dans [18], p. 59.

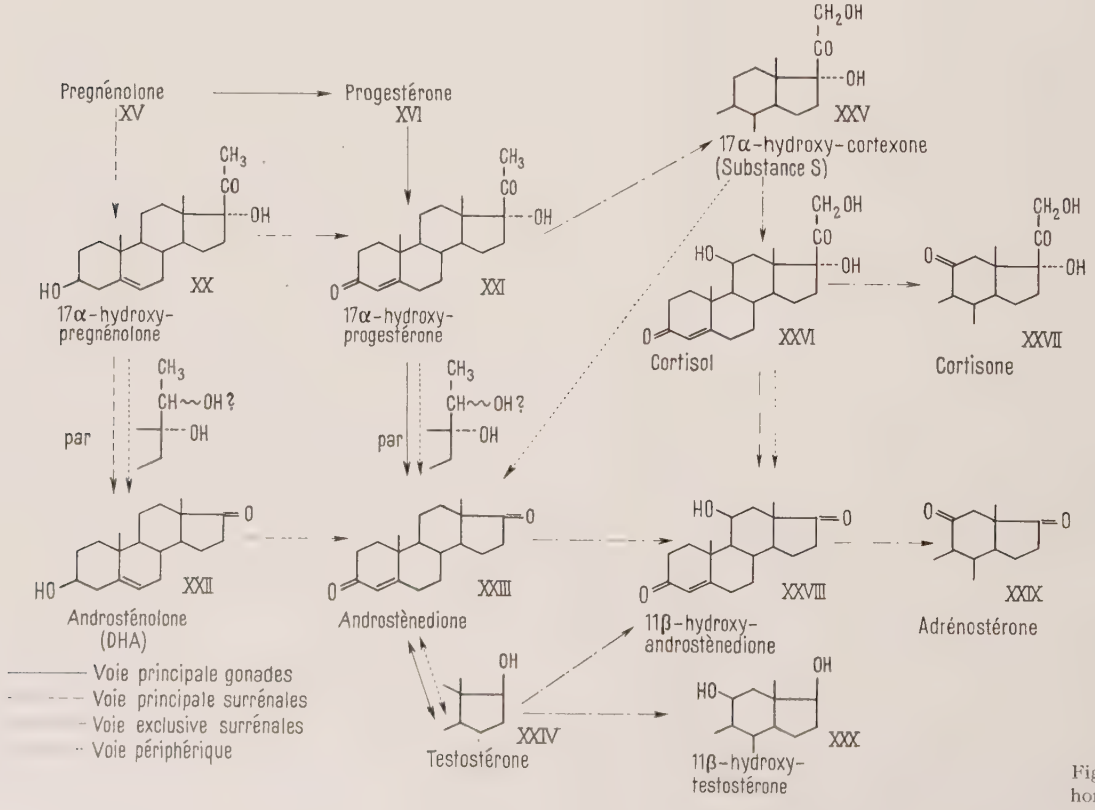


Fig. 4. Biosynthèse des hormones androgènes.

CLAUBERG, mais trouve une application thérapeutique comme progestagène sous forme de 17-esters.

Comme déjà esquissé la 17α-hydroxylation se fait dans les surrénales de préférence déjà au stade de la pregnénolone. En effet la *17α-hydroxy-pregnénolone* (XX) a été obtenue du sang veineux surrénalien[51], et des homogénats de tissus adénomateux de surrénales ont transformé la pregnénolone en androsténolone en passant probablement par XX[39]. Il nous[41] a été possible ces derniers temps de réaliser cette 17α-hydroxylation *in vitro* non seulement avec des homogénats surrénaliens, de préférence avec la solution surnageante, mais aussi avec des homogénats de testicules. Les deux préparations – pour les surrénales de préférence le résidu cellulaire – étaient d'ailleurs aussi capables de dégrader la 17α-hydroxy-pregnénolone en androsténolone. De plus nous avons isolé la 17α-hydroxy-pregnénolone des surrénales mais non des testicules, tandis qu'au contraire l'androsténolone a été obtenue des testicules mais pas des surrénales normales[16]. Tous ces résultats semblent indiquer que la voie qui préfère les Δ^5-stéroïdes se poursuit non seulement dans les surrénales humaines (et ceci dans les glandes saines en principe jusqu'au stade de la 17α-hydroxy-pregnénolone, dans les néoplasmes de préférence jusqu'à l'androsténolone), mais que les testicules possèdent également à un degré restreint cette capacité attribuée autrefois exclusivement aux surrénales.

Le pas suivant dans la biogénèse des androgènes, la *dégradation de la chaîne latérale* de XXI à XXIII ou de XX à XXII, s'effectue sous l'influence de 17,20-desmolases qui ont été décelées de forte activité dans les testicules mais d'activité plus faible dans les ovaires et les surrénales[4]. Le système enzymatique utilise de l'oxygène et TPNH comme cofacteur. La réaction n'est pas liée aux tissus endocriniens, mais se passe aussi à la périphérie, particulièrement dans le foie (LIEBERMAN). Comme produits intermédiaires on a proposé des 17α,20ξ-glycols. Un indice dans ce sens nous a été fourni par l'isolement d'une quantité appréciable de 17α,20α-dihydroxy-Δ^4-pregnène-3-one à partir de surrénales de porc[33] ainsi que de la même combinaison, à côté de très petites quantités de son 20β-épimère, à partir de testicules de porc[27]. Les deux isomères ont également été obtenus par incubation de la 17α-hydroxy-progestérone avec des coupes d'ovaires humains[52], le dernier il y a fort longtemps déjà par perfusion du même précurseur dans la surrénale bovine[53]. La dégradation de la 17α-hydroxy-progestérone en androstènedione avec des homogénats de testicules produit en plus de l'acide acétique (LYNN).

Toute une série de microorganismes, par exemple *Penicillia*[54], sont aussi capables de dégrader la chaîne latérale. A partir de la progestérone quelques-uns produisent, à côté de l'androstènedione, de la testostérone ou les deux dérivés correspondants deshydrogénés en position 1. (Pour le mécanisme de réaction voir [55].)

LIEBERMAN[56] a démontré que le passage de la 17α-hydroxy-pregnénolone à l'androsténolone a réellement lieu *in vivo*. Nous avons déjà parlé de la même transformation par les homogénats de surrénales et de testicules effectuée dans nos laboratoires. Les produits intermédiaires possibles, le 17α,20α-diol et le 17α,20β-diol, sont connus dans ce cas aussi; ils se forment par incubation du précurseur avec des tissus musculaires de lapin[57].

Pour les liens entre les deux voies de synthèse, la transformation de XX en XXI ainsi que XXII en XXIII, il n'y a rien de nouveau à signaler. Ces transformations se passent, comme celle déjà citée de la pregnénolone en progestérone, sous l'influence de la 3β-hydroxy-déhydrogénase puis de celle de l'isomérase. HÖKFELT[58] a transformé dernièrement la 17α-hydroxy-pregnénolone ainsi que la pregnénolone en 17α-hydroxy-progestérone et plus loin en XXV et XXVI au moyen de coupes de surrénales animales et humaines; en plus petite quantité il se formait également XXII. Pour la transformation de l'androsténolone en androstènedione on peut citer à nouveau les travaux de TALALAY[25,26]. A part les enzymes des surrénales[59], ceux des testicules et du foie[60] sont également capables d'effectuer cette réaction.

Parmi les produits finaux on peut considérer *l'androsténolone* et l'androstènedione comme les principaux androgènes de la surrénale humaine[50,56a]. L'androsténolone est formée au dernier stade à la périphérie. On l'a trouvée dans le sang veineux des surrénales[49,50,61], dans des tumeurs surrénaliennes, de plus naturellement en grande quantité dans les urines et, comme déjà dit, dans les testicules, mais jamais dans les surrénales saines. *L'androstènedione* a été isolée de tissus des glandes surrénales, des testicules[27,62] et des ovaires[48], de même, comme déjà cité, des sangs veineux correspondants. Elle est réduite de façon réversible en *testostérone* dans les gonades, particulièrement dans les testicules, en outre dans le foie et dans les reins, mais pas dans les surrénales. Cette réaction semble être produite par deux enzymes différents dépendants l'un de DPN, l'autre de TPN[60] (voir[4]). A partir de testicules

[51] H. CARSTENSEN, G. W. OERTEL et K. EIK-NES, J. biol. Chem. *234*, 2570 (1959).
[52] T. SANDOR et A. LANTHIER, Canad. J. Biochem. *38*, 1167 (1960).
[53] R. I. DORFMAN et F. UNGAR, *Metabolism of Steroid Hormones* (Burgess Publ. Co., Minneapolis 1953), p. 31.
[54] E. VISCHER et A. WETTSTEIN, Adv. Enzymol. *20*, 262 (1958). – D. H. PETERSON, dans [38], p. 93.
[55] G. S. FONKEN et al., J. Amer. chem. Soc. *82*, 5507 (1960).
[56] (a) S. LIEBERMAN et R. V. WIELE, dans [18], p. 153. – (b) S. SOLOMON, A. C. CARTER et S. LIEBERMAN, J. biol. Chem. *235*, 351 (1960).
[57] P. Z. THOMAS, E. FORCHIELLI et R. I. DORFMAN, J. biol. Chem. 235, 2797 (1960).
[58] M. B. LIPSETT et B. HÖKFELT, Exper., en impression.
[59] I. M. P. DAWSON et al., Biochem. Soc., 400th Meeting, Nov. 18 (1960).
[60] CH. D. KOCHAKIAN, dans [18], p. 196.
[61] I. E. BUSH et V. B. MAHESH, J. Endocrin. *18*, 1 (1959).
[62] H. R. LINDNER, Nature *183*, 1605 (1959).

de taureau nous avons isolé à côté de la testostérone «normale» 1/20 de sa quantité en 17-épi-testostérone. Il est intéressant de noter que dans ce tissu la relation androstènedione/testostérone baisse fortement avec l'âge[63]. La transformation réciproque des deux androgènes par des enzymes tissulaires a aussi son équivalent microbiologique.

Dernièrement un chemin de la biosynthèse de la testostérone à partir de la progestérone a été postulé, qui ne passerait pas par la 17α-hydroxy-progestérone et l'androstènedione[64]. Quant à cette conclusion qui se base sur la comparaison de radioactivités spécifiques, il sied d'en appeler aux restrictions de principe déjà citées. Elle est d'ailleurs en contradiction avec les anciens résultats de Samuels[4].

Nous ne pouvons pas entrer dans le détail de la biosynthèse des *androgènes oxygénés en 11*, spécifiques des surrénales, telle qu'elle ressort du schéma 4 des formules. Il est à remarquer, toutefois, que la dégradation de la chaîne latérale peut également s'effectuer à la périphérie (dans le foie) pour la 17α-hydroxy-cortexone (XXV) ou le cortisol. La 11β-hydroxy-androstènedione (XXVIII) a été isolée autrefois par nous des surrénales mais pas des testicules, l'adrénostérone décelée dans les testicules[27], dans les surrénales animales mais pas dans celles de l'homme (voir encore[38,50]). La transformation de la testostérone en XXVIII, XXIX et XXX a été obtenue par des tissus tumoraux de testicules[43]. En analogie avec la série 11-désoxy nous[33] avons réussi à isoler la 11β-hydroxy-17-épi-testostérone, et ceci à partir des surrénales, mais sans obtenir ici la combinaison «normale» en 17.

La production des androgènes dans les surrénales est réglée par l'ACTH, la production dans les gonades par la gonadotropine de l'hypophyse ou du placenta[14,38]. Réciproquement les hormones sexuelles contrôlent à un certain degré la sécrétion de la gonadotropine[65]. Nous reviendrons aux inhibiteurs surrénaux, qui freinent également la biosynthèse des androgènes dans les surrénales, lorsque nous aborderons les corticoïdes.

Hormones œstrogènes. Dans la discussion concernant la biosynthèse des hormones œstrogènes (résumés voir [66–70]) nous toucherons seules les substances qui ne sont aromatisées que dans le noyeau A, c'est-à-dire l'œstrone, les œstradiols et les œstriols, laissant de côté l'équiline et l'équilénine qui se forment probablement par une autre voie. Le premier groupe est formé dans le tissu ovarien, et ceci en quantité variable aux différents stades du cycle, dans les tissus placentaires et testiculaires et sporadiquement dans le tissu surrénalien[50,71]. Tandis que la formation à partir d'acide acétique a été

[63] H. R. Lindner et T. Mann, J. Endocrin. *21*, 341 (1960).
[64] H. Forchielli, M. Gut et R. I. Dorfman, Federation Meeting (Printemps 1961).
[65] F. A. Kincl et R. I. Dorfman, in [34], p. 855.
[66] E. Diczfalusy et Ch. Lauritzen, *Östrogene beim Menschen* (Springer, Berlin 1961), p. 79.
[67] H. Breuer, Z. Vitamin-Hormon-Fermentforsch. *11*, 200 (1960).
[68] W. Dirscherl, dans Ammon et Dirscherl, *Fermente, Hormone, Vitamine* (Thieme, Stuttgart 1960), 3. Aufl., vol. II, p. 223.
[69] L. L. Engel, dans G. Pincus et E. P. Vollmer, *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer* (Academic Press, New York 1960), p. 116.
[70] Ph. A. Katzman, E. A. Doisy et al., Ann. Rev. Biochem. *28*, 269 (1959).
[71] S. R. Stitch, dans [34], p. 701.

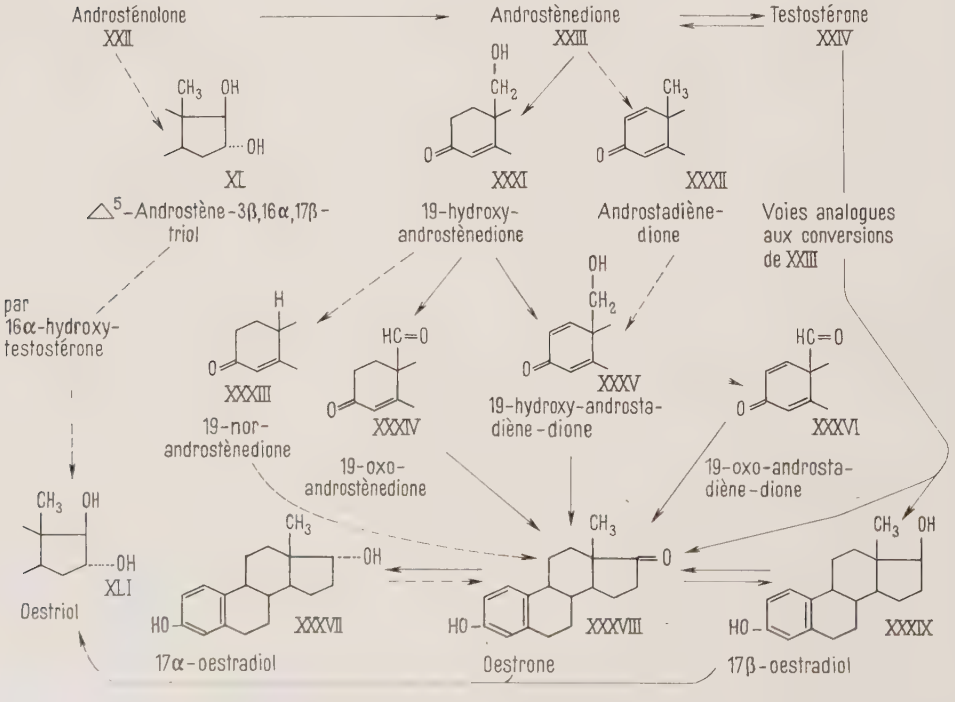


Fig. 5. Biosynthèse d'hormones œstrogènes.

prouvée fréquemment *in vitro*, dans la perfusion et *in vivo*, la question de savoir si le chemin passe principalement par le cholestérol, les combinaisons du pregnène et les androgènes est à discuter. Il est à noter à ce sujet que la transformation du cholestérol signé en œstrone de haute radioactivité a été prouvée chez la femme enceinte[72], que la progestérone et l'œstrone se forment de manière analogue à partir d'acide acétique chez la jument gravide en passant probablement par le cholestérol[73] et que la testostérone est transformée, *in vivo* et *in vitro*, en œstrone et en œstradiol avec un meilleur rendement que l'acide acétique (Dorfman). Les corticostéroïdes, tels que la cortisone, *in vivo*, donnent également des œstrogènes, particulièrement ceux ayant une position 11 oxygénée[66]. Dernièrement Dorfman[74] a proposé un chemin de synthèse conduisant de l'acide acétique aux œstrogènes en évitant le cholestérol et les stéroïdes C_{19}.

Si une preuve absolue des voies biologiques normales n'est pas encore donnée, il semble néanmoins que la transformation des androgènes en œstrogènes soit un cheminement important de la biogénèse; dans tous les cas c'est le seul qui, aujourd'hui, soit représentable par formules, ainsi que nous le montrons dans la Figure 5. Avec des microsomes de placenta humain et TPNH, Ryan[75] a pu transformer l'androstènedione ou la testostérone avec des rendements allant jusqu'à 60% en œstrone (XXXVIII) ou en œstradiol (XXXIX) (voir aussi [76]); Dorfman[74] a même observé un rendement de 80% pour la première réaction. Ces réactions ont également pu être réalisées avec des préparations d'ovaires[76,77], où l'hormone folliculostimuline (FSH) améliorait l'aromatisation[78], soit encore avec des préparations de corps jaunes[79], de testicules[76] et d'un carcinome surrénalien[76]. Ces transformations ont également été observées *in vivo*, chez l'homme et la jument gravide. Elles ne semblent pas nécessairement liées aux tissus endocriniens nommés, car on les a aussi observées chez des femmes ovariectomisées et adrénalectomisées. Que l'androsténolone également puisse servir de produit de départ de l'œstrone résulte d'essais *in vivo* chez l'homme, ainsi que d'essais avec des préparations de placenta *in vitro*[75,80], qui donnèrent une conversion de 70%[74].

Pour la reconnaissance des chemins de réaction les travaux de Meyer[81], datant déjà de 1955, ont montré la voie à suivre; ils ont indiqué que les homogénats surrénaliens transforment l'androstènedione et l'androsténolone en 19-hydroxy-androstène-dione (XXXI). Cette combinaison perdait d'une part facilement du formaldéhyde par scission en milieu légèrement alcalin, selon la méthode de Ehrenstein, pour former la 19-nor-androstène-dione (XXXIII); d'autre part, elle livrait la 19-oxo-androstènedione (XXXIV) par déshydrogénation. Meyer a tout de suite reconnu que XXXI est un produit intermédiaire approprié pour l'aromatisation, puisqu'il était transformé mieux et plus rapidement en œstrone que l'androstènedione dans le placenta. Toute une série de stéroïdes a été hydroxylée en position 19 par des enzymes de surrénales aussi bien que de microorganismes, mais ce n'est que dernièrement qu'il a été possible, après incubation de l'androstènedione avec des microsomes de placenta humain, de déceler son dérivé 19-hydroxy à côté de l'œstrone et de ce fait de trouver pour la première fois une 19-hydroxylase dans un autre tissu animal que dans les surrénales[80]. Même si l'on admet que l'aromatisation se fait par perte de formaldéhyde ou de CO_2 à partir d'un β-carbinol vinylogue ou d'un tel cétoacide, combinée avec une déshydrogénation à un stade propice, il reste encore quantité de chemins de réactions et de produits intermédiaires parmi lesquels nous avons choisi les plus importants dans la Figure 5.

Une première lumière a été engendrée par de nouveaux essais avec des préparations de placenta humain pour la conversion de produits intermédiaires possibles en œstrogènes. D'après Ryan[82] XXXI possède une activité de substrat légèrement plus forte que XXIII et XXIV, tandis que XXXII, le 17β-ol correspondant, ainsi que XXXIII ne possèdent que $^1/_4$–$^1/_5$ de cette activité[83]. Dans des essais de Dorfman également[74,84] XXXII et le 17β-ol correspondant à XXXIII n'ont fourni que des rendements de 20 et 5% en œstrone; les chemins passant par XXXII et XXXIII ne devraient donc jouer qu'un rôle secondaire. Cette constatation est étonnante, puisque XXXII a été trouvé comme métabolite de la progestérone dans les excréments de vaches en gestation[85] et a pu être transformé en œstrone, non seulement par des tissus placentaires, mais aussi d'ovaires et de surrénales. De plus, pour la transformation de XXXIII en œstrogène un même rendement que pour la testostérone a été observé dans un cas de carcinome. Avec des microorganismes[86,87] il a aussi été possible de faire cette transformation et ceci avec des rendements allant jusqu'à 80%.

[72] H. Werbin et al., J. Amer. chem. Soc. *79*, 1012 (1957).
[73] K. Savard, R. I. Dorfman et al., J. biol. Chem. *231*, 765 (1958).
[74] R. I. Dorfman, dans [38], p. 229.
[75] K. J. Ryan, Biochim. biophys. Acta *27*, 658 (1958); Fed. Proc. *17*, 138 (1958); J. biol. Chem. *234*, 268 (1959).
[76] B. Baggett et al., Endocrinol. *64*, 600 (1959).
[77] B. Baggett et al., J. biol. Chem. *221*, 931 (1956). – H. H. Wotiz et M. Gut, J. biol. Chem. *222*, 487 (1956). – N. Hollander et V. P. Hollander, Cancer Res. *19*, 290 (1959).
[78] N. Hollander et V. P. Hollander, J. biol. Chem. *233*, 1097 (1958).
[79] M. L. Sweat et al., Biochim. biophys. Acta *40*, 289 (1960).
[80] J. E. Longchampt, C. Gual, M. Ehrenstein et R. I. Dorfman, Endocrinol. *66*, 416 (1960).
[81] A. S. Meyer, Exper. *11*, 99 (1955).
[82] K. J. Ryan, dans [34], p. 697; Acta endocrin. Suppl. *51*, 697 (1960).
[83] A. S. Meyer, Biochim. biophys. Acta *17*, 441 (1955).
[84] M. Hayano, R. I. Dorfman et al., Acta endocrin. Suppl. *51*, 699 (1960).
[85] W. R. Miller et C. W. Turner, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *90*, 142 (1955).
[86] H. R. Levy et P. Talalay, J. Amer. chem. Soc. *79*, 2658 (1957).
[87] S. Kushinsky, J. biol. Chem. *230*, 31 (1958). – R. C. Meeks et al., Chem. & Ind. *1958*, 391.

DORFMAN a de plus trouvé que la substance XXXIV donne les mêmes taux de conversion que XXXI. C'est ainsi qu'aujourd'hui et d'après les essais *in vitro* les voies indiquées par des flèches pleines sont les plus importantes. Elles comprennent une 19-hydroxylation primaire, suivie d'une déshydrogénation soit du carbinol angulaire en aldéhyde, soit de la liaison des atomes de carbone 1,2, suivie, si cela est nécessaire, d'une nouvelle déshydrogénation ou d'une oxydation aux emplacements indiqués, pour finir par l'élimination du C-19.

Les transformations réversibles de l'œstrone en *17β- et 17α-œstradiol* par des 17-déhydrogénases spécifiques ont été observées *in vivo* mais aussi *in vitro* avec des cellules ou des préparations diverses de tissus également nonendocriniens tels que de foie, de reins, et de sang[88]. Le 17α-œstradiol semble être le produit final chez le bœuf.

L'œstriol (XLI) et ses épimères ont été obtenus par exemple avec des tissus humains d'ovaires, de placenta et plus particulièrement de foie à partir de l'œstrone, du 17β-œstradiol et des combinaisons correspondantes 16α-hydroxy ou 16-oxo[89]. Un chemin de rechange de la biosynthèse passe sûrement de l'androsténolone au Δ^5-androstène-3β,16α,17β-triol (XL) et de celui-ci probablement par la 16α-hydroxy-testostérone. Ces deux substances ont en effet été transformées, avec des rendements très appréciables, par des microsomes de placenta et TPNH, en œstriol, voire en 16α-hydroxy-œstrone[90]. Que les stéroïdes 16α-hydroxylés jouent un grand rôle dans le métabolisme du placenta est démontré par notre récente réussite d'isolement de la 16α-hydroxy-testostérone comme stéroïde le plus important après l'œstriol dans le placenta humain[91]. Pour les combinaisons anti-œstrogènes voir [5].

Hormones cortico-surrénales classiques. Dans la Figure 6 nous avons représenté les 12 étapes possibles de la biosynthèse des hormones de la surrénale (résumés[4, 44, 92–96]), qui par hydroxylations successives de la progestérone en position 17α, 21 et 11β conduisent aux 7 produits de réaction. Les combinaisons indiquées à gauche et en bas, la cortexone (XLII), la 17α-hydroxy-cortexone (XXV), la corticostérone (XLIII) et le cortisol (XXVI) représentent 4 des 6 hormones surrénaliennes classiques. Leurs propriétés de glucocorticoïdes augmentent dans la succession indiquée, tandis que leurs propriétés de minéralocorticoïdes diminuent dans

[88] W. VELLE et S. ERICHSEN, Acta endocrin. *33*, 277 (1960).
[89] G. F. MARRIAN, dans [38], p. 208.
[90] K. J. RYAN, J. biol. Chem. *234*, 2006 (1959).
[91] R. NEHER et A. WETTSTEIN, résultats nouveaux.
[92] A. WETTSTEIN, Monatsschr. Kinderheilk. *108*, 164 (1960).
[93] A. WETTSTEIN, dans [38], p. 233.
[94] G. PINCUS, dans [38], p. 61.
[95] J. K. GRANT, dans [18], p. 24.
[96] CH. TAMM, dans [68], p. 476, 512.

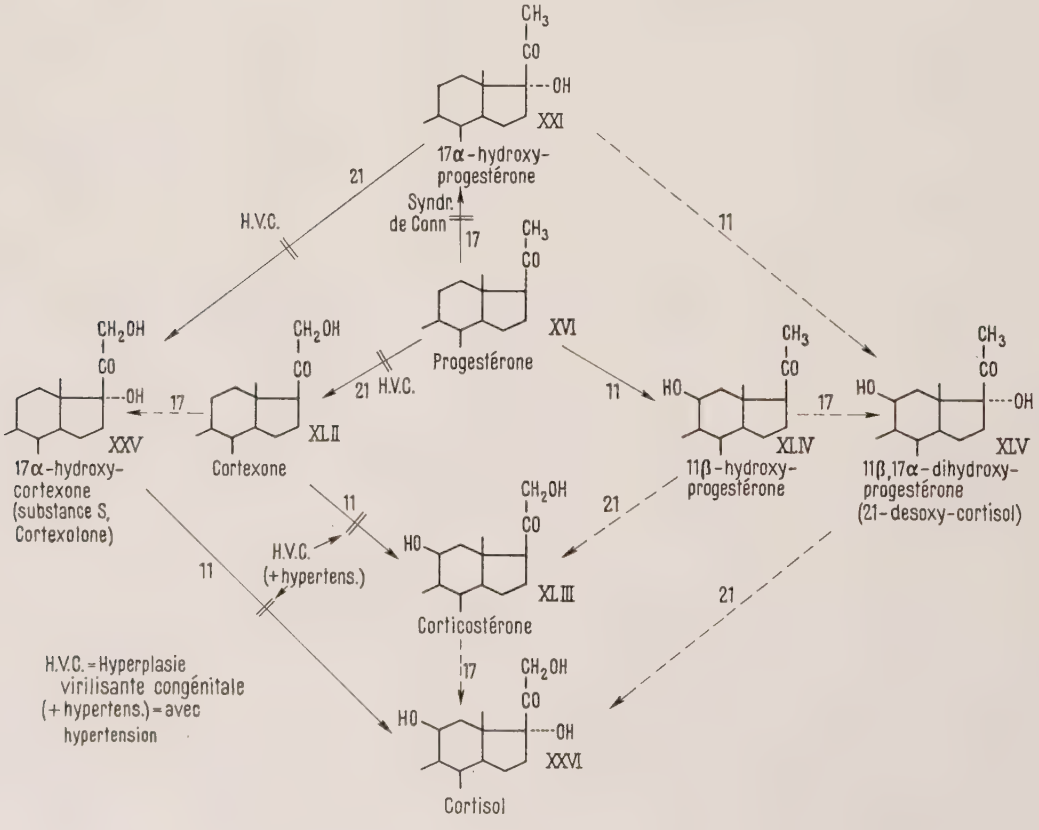


Fig. 6. Biosynthèse des hormones corticoïdes classiques.

ce même ordre[97,98]. Comme l'ont montrées les recherches faites avec le sang des veines surrénaliennes ainsi que de la périphérie, le cortisol et la corticostérone sont, avec des quantités journalières respectives d'environ 20 mg et jusqu'à 2 mg, les plus abondants de ces produits de sécrétion chez l'homme; chez le rat et le lapin c'est par contre la corticostérone qui est de loin la plus abondante. Toutes les 6 combinaisons au centre et à gauche de la Figure ont été obtenues en plus grande quantité du sang veineux surrénalien que du sang artériel[3]. Sur le tableau ne manquent que les deux métabolites 11-oxo de la corticostérone et du cortisol, mais qui peuvent à peine être considérés comme des hormones propres.

La corrélation des différentes *zones de la glande surrénale*[99] avec les enzymes particuliers[4,95,100] et ainsi avec la production hormonale a été étudiée d'une manière approfondie[101,102]. Les zones les plus profondes, réticulaire et particulièrement fasciculaire, contiennent de la 17α-hydroxylase dans leurs microsomes, et de ce fait produisent du cortisol, tandis que seule la zone la plus éloignée du centre et se trouvant directement sous la capsule, la zone glomérulaire, contient de la 18-oxygénase et est capable de former l'aldostérone. Les autres enzymes, particulièrement la 11β-hydroxylase des mitochondries et la 21-hydroxylase des microsomes, semblent être réparties dans toute l'écorce de telle sorte que la corticostérone est produite partout, mais cependant en plus grande quantité totale dans la grande zone fasciculaire.

Toutes les *hydroxylases*, et en particulier la 11β-hydroxylase, spécifique des surrénales chez l'homme et les animaux, semblent être des systèmes d'enzymes combinés[103], qui sans exception utilisent de l'oxygène moléculaire, du TPNH, ce qui est surprenant, et en partie d'autres cofacteurs. Dans la 11β-hydroxylation par les surrénales, ainsi que dans les 11α- et 11β-hydroxylations par des microorganismes un remplacement direct stéréospécifique de l'atome d'hydrogène correspondant a été prouvé[104]. La 21-hydroxylase a été décelée dernièrement également dans les tissus testiculaires normaux et tumoraux[105]. La 11β-hydroxylase se rencontre aussi dans le règne végétal. Avec des microorganismes[92,106–108] toutes les hydroxylations observées dans les surrénales et d'autres tissus de mammifères[109] ont pu être réalisées, sauf celles en positions 2α et 6α et celle en 18 biologiquement si importante (Tableau). De plus les microorganismes sont capables d'hydroxyler presque tous les atomes de carbone, accessibles en principe, de la progestérone et de ses dérivés en exceptant C-4, 5, 8 et 18.

Seuls les groupes 21-hydroxyles des corticostéroïdes (mais ni ceux en position 11, ni ceux en 17) peuvent être éliminés biologiquement.

On devait se demander quels sont parmi tous les *chemins* possibles ceux suivis *de préférence* dans la biosynthèse des corticoïdes. Les réponses ont été fournies par les travaux d'un grand nombre de chercheurs parmi lesquels Hechter, Pincus, Haines, Dorfman, Heard, Samuels, Savard, Lombardo. Ils ont travaillé avec les méthodes les plus diverses: la perfusion, l'incubation de coupes, d'homogénats, de composants de cellules et de préparations d'enzymes des surrénales; de plus, durant les 10 dernières années, ils ont utilisé presque exclusivement des précurseurs marqués radioactifs. Aujourd'hui toutes les transformations indiquées dans la Figure 6 ont été plus ou moins prouvées. Sur les chemins de synthèse marqués en plein il n'y a plus de controverse, ils se confirment dans les nouveaux travaux.

Lombardo[110] a par exemple obtenu avec des coupes et des homogénats de surrénales humaines les conversions maximales suivantes (sous déduction des valeurs moyennes de contrôle): à partir de la progestérone 9% de 17α-hydroxy-progestérone et de cortisol chacun, ainsi que 6% de corticostérone; à partir de la 17α-hydroxy-progestérone 43% de cortisol (mais naturellement pas de corticostérone); à partir de la substance S 11% de cortisol et à partir de la cortexone 34% de corticostérone mais pas de cortisol. Malheureusement la formation des 4 combinaisons sur la ligne médiane du schéma n'a pas été déterminée. La 11β-hydroxy-progestérone a cependant été obtenue par plusieurs chercheurs et avec de bons rendements à partir de la progestérone avec des mitochondries surrénaliennes.

Hydroxylations biologiques de Δ^4-Pregnène-3,20-diones

Au carbone	1	2	6	7	9	10	*11*	12	14	15	16	*17*	*18*	19	*21*
Surrénales			α[a] β				β				α	α	X	X	X
Autres tissus de mammifères		α β	α β	ξ							α				X
Micro-organismes	α	β	β	α β	α	β[b]	α β	α β	α	α β	α	α		X	X

[a] dans stéroïde C_{19} [b] dans 19-nortestostérone

[97] A. Wettstein, Actes Soc. helvét. Sci. nat. 136e Sess. ann. Bâle (1956), p. 22.
[98] A. Wettstein, Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. *62*, 214 (1956).
[99] T. Symington, dans [18], p. 40.
[100] G. M. Tomkins, Ann. N.Y. Acad. Sci. *82*, 836 (1959).
[101] P. J. Ayres, dans [18], p. 50.
[102] J. Stachenko, C. Laplante et C. J. P. Giroud, dans [34], p. 455.
[103] G. M. Tomkins et al., Fed. Proc. *17*, 323 (1958); Biochim. biophys. Acta *28*, 449 (1958).
[104] M. Hayano et al., J. Amer. chem. Soc. *80*, 2336 (1958). – E. J. Corey et al., J. Amer. chem. Soc. *80*, 2338 (1958).
[105] O. V. Dominguez, L. T. Samuels et al., J. biol. Chem. *235*, 2608 (1960).
[106] D. H. Peterson, dans [38], p. 83.
[107] L. L. Wallen et al., *Type Reactions in Fermentation Chemistry* (U.S. Dept. of Agriculture, 1959).
[108] E. Vischer et A. Wettstein, Adv. Enzymol. *20*, 237 (1958).
[109] R. I. Dorfman, Ann. Rev. Biochem. *26*, 523 (1957).
[110] M. E. Lombardo et P. B. Hudson, Endocrinol. *65*, 417 (1959).

En ce qui concerne ces transformations principales, mais seulement celles-ci, il se trouve que les surrénales accomplissent ces hydroxylations dans l'ordre des positions 17α, 21 et 11β, tandis qu'un tel substituant déjà présent dans la molécule empêche l'introduction d'un substituant placé avant lui dans la séquence indiquée. Les substitutions interdites par cette règle représentent les *réactions secondaires* (indiquées en pointillé). Ainsi HEARD[111] a obtenu régulièrement du cortisol à partir de la cortexone au moyen de coupes de surrénales de différentes espèces. Ses résultats ont été mis en doute[44], mais nous avons nous-mêmes isolé le dérivé 6β-hydroxylé de la substance S du mélange d'incubation de la cortexone avec des homogénats surrénaliens[112]. Ces résultats soutiennent la possibilité d'une 17α-hydroxylation comme seconde étape ou étape terminale dans la suite des réactions indiquées. Le renversement des séquences préférentielles n'est pas controversé dans l'hydroxylation de la 11β-hydroxy-progestérone qui, en effet, a fourni de la corticostérone et du cortisol[44,113]. On a aussi démontré que la combinaison XLV est hydroxylable en position 21[114]. La supposition que les voies de la biosynthèse indiquées dans la partie droite de notre schéma soient véritablement des chemins de rechange menant au cortisol est consolidée de manière intéressante par l'isolement, qui nous a tout dernièrement été possible, de la 11β-hydroxy-progestérone[115] ainsi que des dérivés 20-dihydrogénés de cette combinaison et de XLV[33] dans les surrénales de porc.

Pour les chemins de rechange de la biosynthèse des corticoïdes, qui ne passent pas par le cholestérol, nous nous en rapportons à la littérature[4,95].

Il est intéressant de noter l'interruption des différentes réactions d'hydroxylation dans certaines *maladies*[92]. Dans l'aldostéronisme primaire de CONN, il semble que la tumeur surrénalienne présente une défectuosité de la 17α-hydroxylation[116], de telle sorte que la biosynthèse est déviée des glucocorticoïdes vers les minéralocorticoïdes et particulièrement vers l'aldostérone. (Pour le métabolisme des stéroïdes, également dans d'autres tumeurs endocriniennes voir[117]). Dans l'hyperplasie virilisante congénitale[118,119], un syndrôme surrénogénital, il faut faire la différence entre d'une part la forme compensée et la forme entraînant une perte de sel, d'autre part la forme hypertensive. L'image des premières maladies montre un défaut dans la 21-hydroxylation (voir aussi[120]) de telle sorte que la progestérone et la 17α-hydroxy-progestérone s'accumulent dans les surrénales, et de grandes quantités de leurs métabolites, le pregnanediol et le pregnane-3α, 17α,20α-triol sont éliminés par les urines. Dans la forme hypertensive le système de la 11β-hydroxylase est défectueux, ce qui conduit au blocage au stade de la cortexone et de la 17α-hydroxy-cortexone avec une élimination accrue de ses dérivés tétrahydrogénés. Une virilisation est commune à toutes ces formes, provoquée par la déviation de la biosynthèse vers les hormones androgènes, augmentée encore par la surproduction d'ACTH dont la formation n'est plus freinée par le cortisol.

Les récents *antagonistes* des corticostéroïdes[5] sont de grande portée pratique. Dans notre domaine les substances qui nous intéressent sont celles qui ne touchent pas les effets périphériques, mais qui, de façon analogue aux maladies citées, bloquent la genèse des steroïdes sélectivement dans les surrénales. L'amphénone B (3,3-bis-(*p*-aminophényl)-butanone-(2)) freine toutes les 3 réactions hydroxylantes ainsi que la transformation du Δ^5-3β-hydroxy- en Δ^4-3-céto-stéroïdes[121]. La métopirone® (2-méthyl-1,2-bis(3-pyridyl)-propanone-(1))[122], un analogue pyridique de bien moindre toxicité, freine de préférence la 11β-hydroxylation[123], de telle sorte qu'il se forme une image semblable à celle rencontrée dans l'hyperplasie virilisante congénitale avec hypertension. La métopirone® revêt un emploi diagnostique dans les maladies de l'hypophyse[124], ainsi qu'un emploi thérapeutique (en association avec un inhibiteur de l'ACTH, tel qu'un glucocorticoïde) pour l'élimination de sodium. Ces tout derniers temps des substances ont été développées qui freinent sélectivement la 17α-hydroxylation[125].

La *régulation* de la sécrétion des glucocorticoïdes dépend de l'ACTH[18,23], dont la production est elle-même sous l'influence d'un mécanisme «feed back» négatif dirigé par les corticoïdes. Dernièrement un freinage supplémentaire direct de l'action stimulante de l'ACTH sur la biogénèse des stéroïdes surrénaliens par la corticostérone a été démontré[126].

Aldostérone. Pour la biosynthèse de l'aldostérone nous pouvons être bref puisque ce sujet a été abordé déjà plusieurs fois par l'auteur[92,93,97,127]. Dans la Figure 7 on remarque les mêmes 4 combinaisons centrales que pour la biogénèse des hormones classiques des surrénales; cela veut dire qu'ici aussi nous avons affaire à des 21- et

[111] R. D. H. HEARD et al., Rec. Progr. Hormone Res. *12*, 45 (1956).
[112] R. NEHER et A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *39*, 2062 (1956).
[113] J. EICHHORN et O. HECHTER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *97*, 614 (1958).
[114] K. J. RYAN et L. L. ENGEL, J. biol. Chem. *225*, 103 (1957).
[115] R. NEHER et A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *43*, 623 (1960).
[116] P. J. AYRES, J. F. TAIT et al., dans MULLER et O'CONNOR, *Internat. Symp. on Aldosterone* (Churchill, London 1958), p. 73.
[117] R. I. DORFMAN, dans [69], p. 445.
[118] W. R. EBERLEIN et A. M. BONGIOVANNI, Metabolism *9*, 326 (1960).
[119] TH. F. GALLAGHER, dans [38], p. 143.
[120] J. W. JAILER et al., J. clin. Invest. *39*, 904 (1960); *Clinical Endocrinology* (Grune & Stratton, New York 1960), vol. 1, p. 354.
[121] G. ROSENFELD et W. D. BASCOM, J. biol. Chem. *222*, 565 (1956).
[122] W. L. BENCZE et M. J. ALLEN, J. med. pharm. Chem. *1*, 395 (1959).
[123] G. W. LIDDLE et al., J. clin. Endocrin. *18*, 906 (1958). – J. S. JENKINS, G. W. THORN et al., Science *128*, 478 (1958). – J. ROCHE et al., Bull. Soc. Chim. biol. *42*, 913 (1960). – D. K. FUKUSHIMA, T. F. GALLAGHER et al., J. clin. Endocrin. *20*, 1234 (1960).
[124] E. R. FROESCH, A. LABHART, R. NEHER, A. PRADER et W. ZIEGLER, Schwez. Med. Wschr. *89*, 1232 (1959).
[125] J. J. CHART et H. SHEPPARD, Endocrine Soc., Program 43rd Meet. New York, june 1961, p. 20.
[126] F. G. PÉRON et al., dans [34], p. 707.
[127] A. WETTSTEIN, Exp. Ann. Biochim. Méd. *19*, 171 (1957).

11-hydroxylations. La nouveauté réside pour l'aldostérone dans le fait qu'au lieu d'une 17α-hydroxylation nous avons une hydroxylation en position 18, et que ce groupe hydroxyle est ensuite déshydrogéné à un stade propice en aldéhyde. La figure montre les 20 réactions possibles, qui se combinent en 12 voies différentes pour passer de la progestérone à l'aldostérone; elles englobent au total 10 produits intermédiaires.

Après notre première démonstration de la transformation de la cortexone en 18-hydroxy-cortexone (XLVIII)[128] et en aldostérone (LIII)[129] avec des homogénats de surrénales, d'autres chercheurs[102,130–133] ont réussi à transformer en plus la progestérone, la 11β-hydroxy-progestérone et la corticostérone en aldostérone par des méthodes *in vitro* et ceci avec des rendements comparables entre les différents précurseurs (voir aussi [134, 135]). Des résultats semblables ont été obtenus dans la perfusion *in vivo*.

Parmi les substances intermédiaires possibles, la formation de la 18-hydroxy-cortexone, déjà connue, a aussi été observée à partir de précurseurs endogènes dans l'incubation de surrénales[136]. Puis on a produit la 18-hydroxy-corticostérone (LII) à partir de la progestérone[137,138]. Cette combinaison extraordinairement instable avait été obtenue par synthèse totale dans nos laboratoires et nous l'avions transformée en aldostérone par des homogénats de surrénales[139]. Ainsi le deuxième échelon de la biosynthèse de l'aldostérone à partir de la corticostérone était démontré. Dans l'incubation de la progestérone ou de la cortexone avec des homogénats de surrénales une substance qui pourrait être la 18-oxo-cortexone (IL) a été décelée[140] récemment.

Comme l'inventaire des faits obtenus présente encore de grandes lacunes, nous poursuivons actuellement par

[128] F. W. Kahnt, R. Neher et A. Wettstein, Helv. chim. Acta *38*, 1237 (1955).
[129] A. Wettstein, F. W. Kahnt et R. Neher, CIBA Found. Colloq. Endocrin. *8*, 170 (1955).
[130] P. J. Ayres, J. F. Tait, S. A. S. Tait et al., Acta endocrinol. *33*, 27 (1960); Biochem. J. *70*, 230 (1958).
[131] C. J. P. Giroud, J. Stachenko et P. Piletta, dans [116], p. 56.
[132] P. J. Mulrow et G. L. Cohn, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *101*, 731 (1959).
[133] E. Rosemberg, R. I. Dorfman et al., Endocrinol. *58*, 708 (1956).
[134] J. J. Barlow, D. A. Holub et J. W. Jailer, Clin. Res. *8*, 373 (1960).
[135] S. Ulick et S. Solomon, J. Amer. chem. Soc. *82*, 249 (1960).
[136] F. G. Péron, Endocrinol. *66*, 458 (1960), et publication sous presse. – M. K. Birmingham et P. J. Ward, J. biol. Chem., sous presse.
[137] S. Ulick et K. Kush, J. Amer. chem. Soc. *82*, 6421 (1960).
[138] Pour le rôle de LII dans la biogénèse, voir: R. Neher et A. Wettstein, Helv. chim. Acta *43*, 623 (1960).
[139] J. Schmidlin et A. Wettstein, Conférence Congrès des Biochimistes Allemands-Français-Suisses, Zürich (Octobre 1960).
[140] O. V. Dominguez, D. W. Urry et L. T. Samuels, Fed. Proc. *20*, 180 (1961).

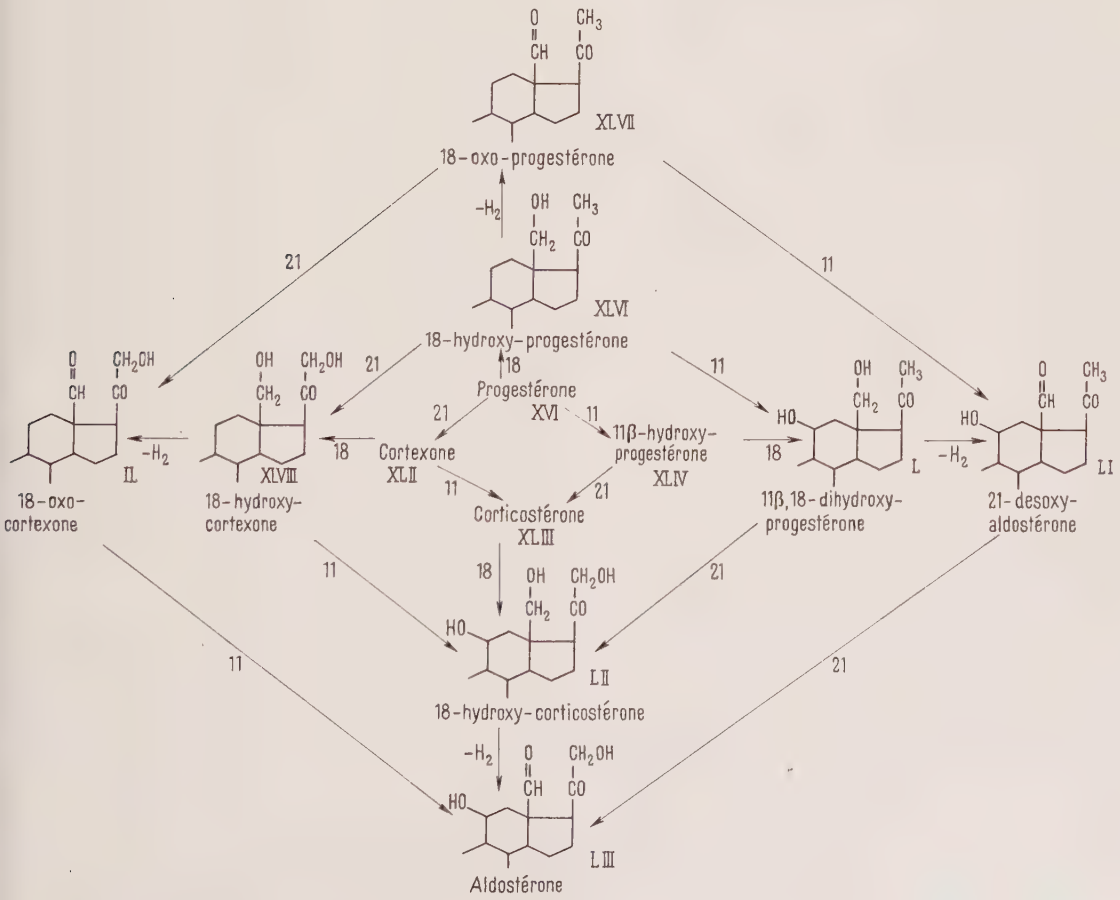


Fig. 7. Biosynthèse de l'aldostérone.

l'expérience et systématiquement l'investigation des différents stades encore obscures de la synthèse. Une condition essentielle, exigée pour ces recherches, était la *préparation synthétique* des produits intermédiaires hypothétiques, tout d'abord pour apprendre à connaître leurs propriétés et pouvoir les déceler dans les mélanges biologiques; pour avoir ensuite la possibilité de les utiliser, eux qui se trouvent en si infimes quantités dans les préparations de surrénales, pour l'étude de leurs transformations biologiques subséquentes dans les voies de la biogénèse. Au début de nos nouvelles recherches certains des produits intermédiaires étaient encore inconnus comme substances chimiques. Entretemps nous les avons cependant préparés par synthèse, à l'exception de la 18-oxo-cortexone (IL). Il s'agit de la 18-oxo-progestérone (XLVII)[141], de la 11β,18-dihydroxy-progestérone (L)[142] et de la 21-désoxy-aldostérone (LI)[141].

Le problème qui se posa ensuite fut de développer une *méthode de séparation* appropriée. Les meilleurs résultats furent obtenus par un «screening» dans la chromatographie sur papier en utilisant comme substances de repère les produits de transformation déjà connus, tels que les substances 17α-hydroxylées, ainsi que la gamme complète des 11-oxo-dérivés présumés comme métabolites. Parmi ces derniers 4 durent tout d'abord être synthétisés (11-oxo-18-hydroxy-progestérone; 11,18-dioxo-progestérone; 11-oxo-18-hydroxy-cortexone et 11,18-dioxo-cortexone). Nous avons pu constater que la combinaison de 2 à 3 systèmes chromatographiques suffisait pour différencier toutes les substances nommées.

Dans le groupe des substances de *faible polarité*, qui comprend principalement des progestérones monooxygénées, les valeurs Rf sont en général suffisamment différentes (voir Figure 8), particulièrement celles de la 18-hydroxy et de la 18-oxo-progestérone qui nous intéressent spécialement. Il est à remarquer que la première, qui ne se différencie pas de la 17α-hydroxy-progestérone dans le premier système de solvants, se transforme quantitativement dans la chromatographie avec le système Bush B_3 en un artéfact de polarité beaucoup plus faible, ce qui permet une identification sans équivoque.

La Figure 9 illustre les conditions établies dans le groupe des substances de *polarité moyenne*, principalement des progestérones di-oxygénées. Ici saute aux yeux la différenciation propice de la 11β,18-dihydroxy-progestérone et de la 21-désoxy-aldostérone, deux nouveaux produits intermédiaires qu'il nous a ainsi été possible de déceler pour la première fois.

Grâce au développement de ces moyens diagnostiques, il fut possible, enfin, d'aborder le problème principal. Tout d'abord nous avons incubé une progestérone, marquée au tritium et hautement purifiée, avec des homogénats de surrénales et analysé les extraits. Le résultat d'un essai typique est démontré dans le radiogramme de la Figure 10. L'abscisse indique la distance parcourue sur le papier et l'ordonnée le compte des impulsions par minute. Le compteur indiqua un maximum important coïncidant avec l'emplacement de la 18-oxo-progestérone synthétique, chromatographiée simultanément. A sa gauche se trouve un autre maximum moins important, qui provient vraisemblablement de la 11-oxo-progestérone.

La Figure 11 montre un maximum significatif à l'endroit de la 21-désoxy-aldostérone, séparé proprement de la large bande de haute radioactivité située à gauche, qui comprend principalement la corticostérone et la 17α-hydroxy-cortexone.

Nous avons ensuite dilué les 18-oxo-progestérone et 21-désoxy-aldostérone décelées avec les produits cor-

[141] A. WETTSTEIN et al., résultats nouveaux.
[142] J. SCHMIDLIN et A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *42*, 2636 (1959).

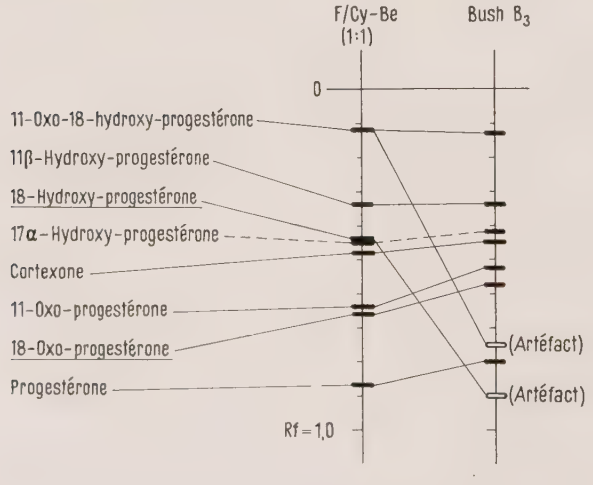


Fig. 8. Séparation par chromatographie sur papier des stéroïdes présumés de polarité faible.

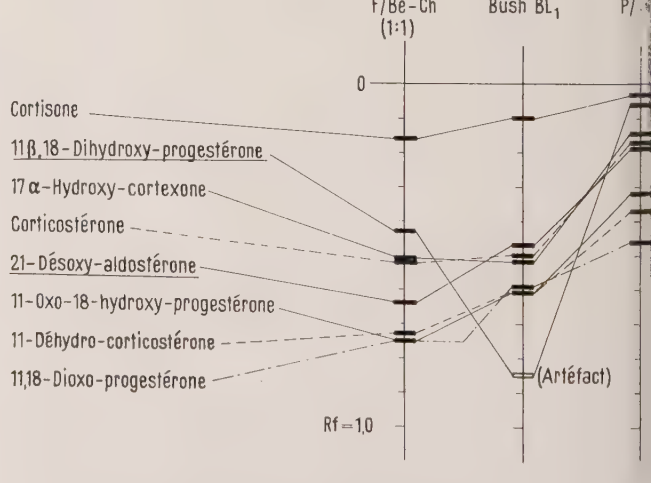


Fig. 9. Séparation par chromatographie sur papier des stéroïdes présumés de polarité moyenne.

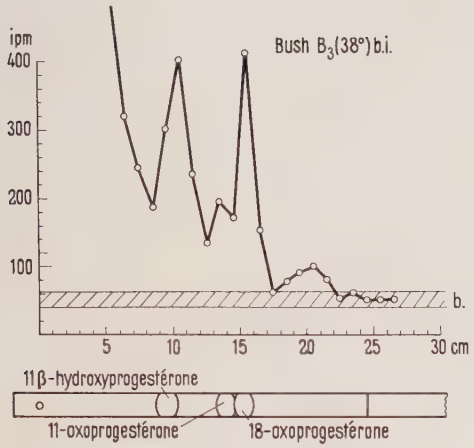


Fig. 10

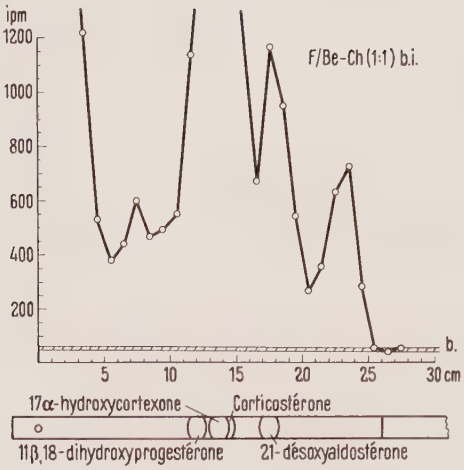


Fig. 11

respondants synthétiques, nous les avons purifiés comme précédemment, pour obtenir finalement des substances cristallisées parfaitement pures et de radioactivité constante. Sur la base de la radioactivité mesurée le rendement biochimique déterminé fut de l'ordre de $1^0/_{00}$ dans les essais effectués jusqu'ici. Pour cette faible valeur existent naturellement les différentes explications déjà bien connues. Nous croyons dans tous les cas avoir montré que ces deux substances représentent des produits biosynthétiques dérivés de la progestérone. Ainsi, pour la première fois, l'aldostérone mise à part naturellement, un procédé biosynthétique a donc fourni deux substances qui possèdent le groupe aldéhyde en position 18, caractéristique de l'aldostérone[141]. Qu'elles soient des produits intermédiaires de la biogénèse de l'aldostérone doit encore être démontré par leurs transformations subséquentes.

Les antagonistes de l'aldostérone du type des spirolactones[143] aussi bien que ceux comprenant des substances non-stéroïdes[144], ne sont pas traités ici puisqu'ils n'interviennent pas dans sa biogénèse. D'autre part les bloqueurs de l'hydroxylation en position 11, qui freinent aussi la biosynthèse de l'aldostérone, ont déjà été mentionnés plus tôt. On ne connait pas encore d'inhibiteur de l'oxygénation en position 18.

Pour la régulation de la sécrétion de l'aldostérone les conceptions ont beaucoup changé ces tout derniers temps. Selon les conceptions prévalantes jusqu'ici[92] les facteurs hémodynamiques agiraient par des récepteurs sensibles aux variations de pression et de volume, situés dans l'oreillette droite[145], provoquant dans l'épiphyse (glande pinéale) et la partie postérieure du diencéphale le déversement d'une substance considérée comme l'agent spécifique de la régulation de la sécrétion de l'aldostérone, la glomérulostimuline[146]. Dernièrement on a cependant constaté que l'agent stimulant ne pouvait pas se former dans le névraxe ou l'hypophyse[147] et notamment pas dans l'encéphale, puisqu'une saignée provoque une augmentation de la sécrétion d'aldostérone même chez des animaux décapités[148]. Comme d'autre part, chez l'homme, des doses d'angiotensine II[149] déclenchent régulièrement une forte hypersécrétion d'aldostérone[150,151], on en a déduit l'existence d'un facteur rénal contrôlant la sécrétion. Cette hormone stimulante semblerait être la rénine ou une substance analogue[148].

Summary. The different pathways of biosynthesis are described, by which steroid hormones are produced *in vivo* in the gonads, the adrenal cortex and the placenta, or *in vitro* by corresponding tissue preparations. First of all a short outline of the origin of cholesterol from acetyl coenzyme A through the 'biological isoprene unit', the pyrophosphate of Δ^3-iso-pentenol, through squalene, lanosterol and zymosterol is given. Partial side-chain degradation of cholesterol, where ACTH plays an important role, leads to pregnenolone and further to progesterone.

The latter compounds are the starting material for the other steroid hormones. On the one hand, they are converted in the gonads and adrenals into 17α-hydroxy derivatives, in which the side chain is completely removed by enzymes of the said and also of non-

[143] Aperçus: C. L. Gantt, N.Y. J. Med. *61*, 756 (1961). – F. C. Bartter, *Clinical Use of Aldosterone Antagonists* (Springfield 1960).

[144] Plusieurs publications dans Fed. Proc. *20*, 409–410 (1961).

[145] F. C. Bartter et D. S. Gann, Circulation *21*, 1016 (1960).

[146] G. Farrell, dans [24], p. 57.

[147] D. A. Denton et al., dans Astwood, *Clinical Endocrinology* (Grune & Stratton, New York 1960), vol. I, p. 373.

[148] J. O. Davis et al., dans [34], p. 77; Amer. J. Physiol. *200*, 437 (1961).

[149] Aperçu: R. Schwyzer et H. Turrian, Vitamins and Hormones *18*, 237 (1960).

[150] J. Genest et al., Acta endocrinol. *35*, 413 (1960); dans [34], p. 173; dans Reubi-Bock-Cottier, *Essentielle Hypertonie* (Springer, Berlin 1960), p. 143; J. clin. Invest. *40*, 338 (1961).

[151] J. H. Laragh et al., J. Amer. med. Assoc. *174*, 234 (1960); Ann. int. Med. *53*, 259 (1960).

endocrine tissues, to form the androgens. Furthermore the adrenals produce their own typical androgens. After hydroxylation of the angular 19-methyl group, androgens are aromatised to estrogens.

On the other hand, the adrenal converts progesterone by hydroxylation in 21- and, depending on the case, also in 11- and/or 17-position into the classical adrenocortical hormones. The special feature of an 18-hydroxylation and -dehydrogenation forms part of the biogenesis of aldosterone; a new example is given fo the methods used towards its elucidation, consisting i the biosynthetic conversion of progesterone into tw virtual intermediates, 18-oxo-progesterone and 21 desoxyaldosterone, which already contain the 18 aldehyde group, characteristic for aldosterone.

The regulation of the biogenesis of the differen hormones is mentioned and compounds are discusse which block one or other of the biosynthetic steps.

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Report

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslic der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsibl for the opinions expressed by their correspondents.

Abdrücke aus hochmolekularen Polyamiden von Kristallgitterflächen als Matrizen

I. In einer Kurzmitteilung wurde vom Verfasser über die orientierte Aufwachsung (Epitaxie) des hochmolekularen Polyamids der ε-Aminocapronsäure (Nylon 6) auf (100) von KCl berichtet[1]. Der Nachweis dieser Orientierung gelang nach einem neuentwickelten «Abdruckverfahren», das allgemein zur Feststellung von orientierten Aufwachsungen hochmolekularer Stoffe mit dem Lichtmikroskop geeignet ist, und zwar auch dann, wenn die verwachsenen Teilchen an sich unterhalb der Sichtbarkeitsgrenze des Lichtmikroskops liegen.

Nach diesem Abdruckverfahren, bei dem die Trägerfläche sozusagen als Matrize wirkt, wird der hochmolekulare Stoff als dünner Film auf die Fläche aufgebracht und vorzugsweise nach dem Ablösen des Trägers durch Aufwachsungsversuche mit geeigneten Gastsubstanzen auf der Kontaktfläche des Filmes festgestellt, ob eine Orientierung und gegebenenfalls welcher Art eingetreten ist. Extrem dünne Filme orientieren sowohl auf der Kontaktfläche als auch auf deren Rückseite, so dass bei Anwendung derartiger Filme ein Ablösen des Filmes von der Trägerfläche zum Nachweis der Orientierung dann nicht erforderlich ist, wenn die Orientierung der Gastsubstanz auf dem Film in anderer Weise erfolgt als auf der Matrize.

Inzwischen wurden auch orientierte Abdruckfilme aus hochmolekularen Polyamiden von einer Reihe von Flächen anderer Kristallgitter erhalten, so zum Beispiel von (100) KBr, und, wie unter dem unten behandelten immunologischen Gesichtspunkt besonders bemerkenswert erscheint, von (100) des Rohrzuckers. Als Polyamide für diese Abdrücke wurden ausser dem Polyamid von ε-Aminocapronsäure das Polyamid aus Hexamethylendiamin und Adipinsäure (Nylon 66) sowie Sebacinsäure (Nylon 6,10) benutzt.

Der Abdruckfilm der Figur 1 besteht aus dem erstgenannten Polyamid, die als Gastsubstanz orientiert aufgewachsenen Kristallnadeln aus Pentachlorphenol.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Aufwachsungen, über die im einzelnen an anderer Stelle berichtet werden wird[2], hat ergeben, dass die Orientierung der Polyamide an der Kristallfläche in Form eines Netzes von Fibrillen erfolgt (Figur 2).

Untersuchungen über die Einzelheiten des Gesetzes dieser Verwachsungen sind noch im Gange. Die von Fischer[3] durchgeführte Aufklärung der von J. und I. Willems[4] gefundenen orientierten Aufwachsungen de Polyäthylens auf (100) von NaCl hat gezeigt, dass di Orientierung dieses Makromoleküls den gleichen geo metrischen Bedingungen unterliegt, wie sie für die Epi taxie im niedermolekularen Bereich charakteristisch sind Die bisherigen Ergebnisse der elektronenmikroskopische Untersuchungen der Aufwachsung der Polyamide stehe hiermit offensichtlich grundsätzlich in Übereinstimmung wenn auch Einzelheiten noch der Aufklärung bedürfen Für die Anzahl und Art der von den Polyamidfibrillen de jeweils verwachsenen Polyamids eingenommenen ver schiedenen Stellungen und damit für die Form de

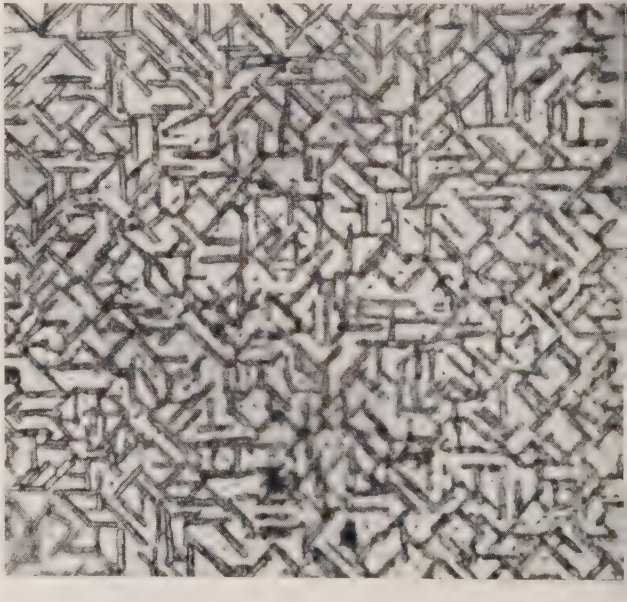


Fig. 1. Orientierte Aufwachsung von Pentachlorphenol auf einem Abdruckfilm aus Polyamid des Hexamethylendiamins mit Adipinsäure. Abdruck von (100) KCl.

[1] J. Willems, Exper. *15*, 175 (1959).
[2] E. W. Fischer, H. Orth und J. Willems, noch nicht veröffentlicht.
[3] E. W. Fischer, Kolloid-Z. *159*, 108 (1958).
[4] J. Willems und I. Willems, Exper. *13*, 465 (1957). – J. Willems, Faraday Soc. Discuss. *1958*, Nr. 25, 111.

Fig. 2. Abdruckfilm aus Polyamid des Hexamethylendiamins mit Sebacinsäure. (100) KCl. (Aufnahme: E. W. Fischer)

Maschen des von den Fibrillen gebildeten Netzes ist eine Strukturanalogie zwischen der Verwachsungsfläche von Wirtskristall und Polyamidfibrille massgebend. Dabei dürfte auf Grund der auf dem Gebiet der Epitaxie im niedermolekularen Bereich vorliegenden Erfahrung eine eindimensionale Strukturanalogie zwischen Polyamid und Matrize bereits hinreichend sein.

Als Verknüpfungsstellen des Polyamids mit den Verknüpfungsstellen der Matrize (zum Beispiel Ionen der Alkalihalogenide oder Dipolen des Rohrzuckers) werden in erster Linie dessen polare Amidgruppen in Frage kommen; dabei wird besonders die Ausbildung von Wasserstoffbrücken in Betracht zu ziehen sein. Bernal[5] hat am Beispiel der Orientierung des Polyäthylenmoleküls auf NaCl darauf hingewiesen, dass hierbei auch eine gewisse Streckung (Entfaltung) des Makromoleküls eintritt.

II. Bekanntlich wird eine Reihe von Erscheinungen biologisch spezifischer Aktivität auf Abdruckvorgänge unter Mitwirkung von hochmolekularen Polyamiden, nämlich Proteinen, zurückgeführt; als besonders eindrucksvolles Beispiel sei hier nur die Antikörperbildung genannt. Die von Pauling[6] vertretene Theorie der Antikörperbildung geht von der von Breinl und Haurowitz[7] entwickelten Vorstellung aus, dass Antikörper und Antigen eine komplementäre Struktur besitzen. Zu den Einzelheiten dieser Theorie sei auf die einschlägige Literatur verwiesen[8]. Nach dieser Vorstellung werden die antigenen Bezirke an der Oberfläche der natürlichen Antigene ebenso wie die determinanten Gruppen der künstlichen Antigene, zum Beispiel Azoprotein, von dem Antikörper bildenden Polyamidmolekül, das heisst dem Globulinmolekül, räumlich umhüllt, so dass sich ein taschenförmiger, räumlicher, negativer Abdruck bildet.

Der experimentelle Nachweis, dass Polyamide charakteristische netzförmige flächenhafte Abdrücke von atomaren oder auch molekularen Anordnungen zu bilden vermögen, wirft die Frage auf, ob diese Abdrücke als Modelle für die Antikörperbildung angesehen werden können. Als verknüpfende Stellen des Antigens bieten sich in erster Linie die polaren Gruppen der antigenen Bezirke der natürlichen Antigene und die determinanten Gruppen einschliesslich der damit verbundenen Tyrosin- und Histidinreste der künstlichen Antigene an.

Einzelheiten zu der Vorstellung über die Entstehung von Antikörpern durch Bildung von flächenhaften Abdrücken der massgebenden Stelle der Antigenoberflächen durch das Protein des Antikörpers im Wege der orientierten Verwachsung (Epitaxie) werden an anderer Stelle veröffentlicht.

Summary. The macromolecules of high molecular polyamide films obtained in contact with (100) of KCl, KBr, and sucrose as a matrix are oriented by overgrowth in the form of a characteristic network of fibrils. This network formation of polyamides in contact with the atomic arrangement in crystal lattice planes as a matrix is proposed as a model for antibody formation.

J. Willems

Krefeld (Deutschland), Tiergartenstrasse 21, 15. Mai 1961.

[5] J. D. Bernal, Faraday Soc. Discuss. *1958*, Nr. 25, 12.
[6] L. Pauling, J. Amer. chem. Soc. *62*, 2643 (1940).
[7] F. Breinl und F. Haurowitz, Z. physiol. Chem. *192*, 45 (1930).
[8] Vgl. aus neuester Zeit z. B. die zusammenfassende Darstellung von F. Haurowitz, Z. angew. Chem. *73*, 153 (1961).

Sulfur Exchange Between Thiotaurine and Hypotaurine

In a previous paper, spontaneous transulfuration between thiotaurine and cysteinesulfinic acid, and between alaninethiosulfonic acid and hypotaurine, has been reported[1].

We now present some data supporting a similar reaction between thiotaurine and hypotaurine, obtained by the use of labelled compounds.

^{35}S-thiotaurine and hypotaurine were prepared enzymically by the following procedure. Labelled cysteamine and elementary sulfur were incubated with an enzyme preparation from hog kidney, precipitated between 20 and 60% ammonium sulfate saturation, under the experimental conditions reported elsewhere[2]. The enzyme produces hypotaurine and thiotaurine from thiocysteamine formed from the combination of cysteamine with elementary sulfur[2]. The reaction mixture was chromatographed in phenol, labelled thiotaurine and hypotaurine were localized in the chromatogram by radio-scanning

[1] C. De Marco and M. Coletta, Exper. *16*, 534 (1960).
[2] D. Cavallini, C. De Marco, and B. Mondovì, Enzymologia *23*, 101 (1961).

and eluted separately in a minimum amount of 0.01 *M* phosphate buffer pH 7.4. The eluates from several chromatographic strips were combined to obtain sufficient amounts of labelled compounds.

A 10^{-3} *M* solution of pure thiotaurine[3] was added with labelled thiotaurine: 0.5 ml of this solution were chromatographed in phenol, and the strip was scanned for radioactivity by passing it under the mica window of a Geiger counter, protected by a lead shield with a 1.5 cm long window: 1.5 cm long portions of the strip were counted for 1 min each (Figure a).

The same solution was then made 10^{-3} or $3 \cdot 10^{-3}$ *M* in respect to hypotaurine, and, after 15 min standing, 0.5 ml were chromatographed, and scanned quantitatively for radioactivity (Figure b, c).

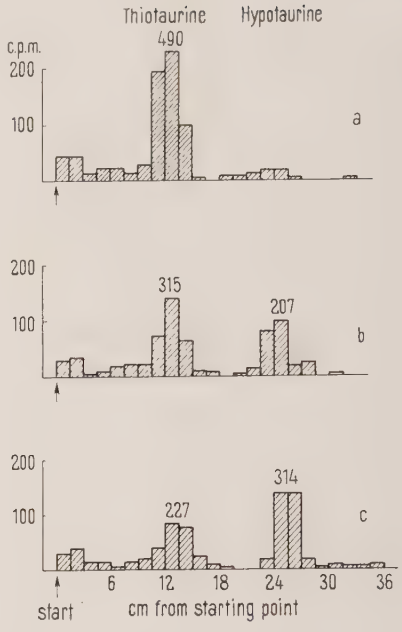
The procedure was repeated with a 10^{-3} *M* solution of pure hypotaurine[4] labelled by the addition of ^{35}S hypotaurine and then added with thiotaurine.

These experiments show that radioactivity passed from labelled thiotaurine to hypotaurine and *vice versa*, and demonstrate the occurrence of a readily spontaneous transulfuration reaction.

This reaction, like those described previously, is of some interest also from a technical point of view. Transulfuration could in fact be responsible for the appearance in radiochromatograms of unexpected radioactive spots upon addition of unlabelled compounds.

Finally, the above results clearly demonstrate that spontaneous transulfuration between compounds of the *R*-SO_2-SH and *R*-SO_2H type is a general reaction for compounds in which *R* is either a HOOC-$CHNH_2CH_2$- or a H_2N-CH_2-CH_2-residue.

Résumé. Les auteurs ont préparé avec une enzyme de la thiotaurine et de l'hypotaurine marquées par le et S^{35} ont démontré que ces deux composés peuvent échanger spontanément un atome de soufre en se transformant l'un dans l'autre.



Unidimensional chromato-radiograms developed in phenol of: (a) labelled thiotaurine; (b) labelled thiotaurine (final concentration $10^{-3}M$) added with unlabelled hypotaurine (final concentration 10^{-3} *M*); (c) labelled thiotaurine (final concentration 10^{-3} *M*) added with unlabelled hypotaurine (final concentration $3 \cdot 10^{-3}$ *M*).

C. DE MARCO and L. TENTORI

Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Roma e Istituto Superiore di Sanità, Roma (Italy), April 28, 1961.

[3] D. CAVALLINI, C. DE MARCO, and B. MONDOVÌ, Bull. Soc. Chim. biol. *40*, 711 (1958).
[4] D. CAVALLINI, C. DE MARCO, B. MONDOVÌ, and F. STIRPE, R. Accad. Naz. Lincei *18*, 552 (1955).

'Cystine Monosulfoxide' and Related Compounds

The oxidation states which are intermediate between cystine (I) and cysteic acid (VII) are of considerable interest in studies of the metabolism of cystine[1] and the oxidation of cystine residues in proteins[2,3]. Until recently only two of the possible intermediate oxidation products had been synthesized; the thiolsulfonate (III)[4–6] and the sulfinic acid (VI)[7]. Syntheses have been reported of the corresponding thiolsulfinate (II)[4,8,9], disulfone (IV)[10] and sulfenic acid (V)[11], some of which were unstable, but as these products had variable compositions, they were probably mixtures. Last year in this journal[12] a new synthesis of the 'monosulfoxide' (II) was described, whereby III was reduced with HI to give a stable product.

I Cys–S–S–Cys
II Cys–S–SO–Cys
III Cys–S–SO_2–Cys
IV Cys–SO_2–SO_2–Cys
V Cys–SOH
VI Cys–SO_2H
VII Cys–SO_3H

Cys = *L*-–CH_2–$CH(NH_2)(CO_2H)$

This preparation[12] has been repeated. However, when the product is examined by paper electrophoresis in 10% acetic acid, or better paper electrophoresis followed by paper chromatography in the transverse direction[13], it is found to be a mixture of (I) and (III). On polarographic reduction in 0.1 *N* HCl solution at the dropping mercury cathode, the 'monosulfoxide' gives a complex wave with inflections at -0.18 *V* and -0.45 *V* (versus the saturated calomel electrode). Under the same conditions and in the same voltage range III and I give simple waves with half-wave potentials at -0.18 *V* and -0.45 *V* respectively, again suggesting that the 'monosulfoxide' product is a

[1] L. YOUNG and G. A. MAW, *The Metabolism of Sulphur Compounds*, Chapter V (Methuen, London 1958).
[2] J. A. MACLAREN, S. J. LEACH, and I. J. O'DONNELL, Biochim. biophys. Acta *35*, 280 (1959).
[3] J. A. MACLAREN, S. J. LEACH, and J. M. SWAN, J. Text. Inst. *51*, T665 (1960).
[4] G. TOENNIES and T. F. LAVINE, J. biol. Chem. *113*, 571 (1936).
[5] R. EMILLIOZI and L. PICHAT, Bull. Soc. chim. Fr. *1959*, 1887.
[6] B. J. SWEETMAN, Nature (Lond.) *183*, 744 (1959) has shown that this substance has the thiolsulfonate structure (III) and not the 'disulfoxide' structure of TOENNIES and LAVINE[4].
[7] T. F. LAVINE, J. biol. Chem. *113*, 583 (1936).
[8] G. TOENNIES, J. Amer. chem. Soc. *56*, 2198 (1934).
[9] H. GRÄFJE, Diplomarbeit Giessen (1955) and private communication.
[10] G. TOENNIES and T. F. LAVINE, J. biol. Chem. *105*, 107 (1934).
[11] G. TOENNIES, J. biol. Chem. *122*, 27 (1937–1938).
[12] G. E. UTZINGER, Exper. *16*, 136 (1960).
[13] This combination of techniques was suggested by Dr. W. E. SAVIGE of this laboratory. The solvent used was the mixture 'P' of T. L. HARDY, D. O. HOLLAND, and J. H. C. NAYLOR, Analyt. Chem. *27*, 971 (1955).

mixture. When allowed to react with sulphite ion 1 Mol of the 'monosulfoxide' produced 0.5 Mol of thiol as measured by amperometric titration with mercuric chloride[14]. This is difficult to explain on the basis of structure (II) but can be reconciled with the assumption that the product is an equimolar mixture of (I) and (III), since (III) does not yield thiol under these conditions[3]. The hypothesis that the 'monosulfoxide' is an equimolar mixture of (I) and (III) agrees with the figures[12] for elementary analyses and equivalent weight; and the specific rotation ($[\alpha]_D^{24} = -111°$)[12] is approximately the mean of the rotations of I (– 213°) and III (– 22°). Contrary to the previous report[12] it is now found that in the region 7–10 μ the infra-red spectra[15] of the 'monosulfoxide' and of an equimolar mixture of I and III are indistinguishable. Simple aliphatic and aromatic thiolsulfinates are unstable and readily disproportionate into a mixture of the corresponding disulfide and thiolsulfonate[16,17] and it is possible that 'cystine monosulfoxide' decomposes in this way as soon as it is formed in the acidic solution (HCl + KI).

To further investigate possible intermediate oxidation products of cystine, the performic acid oxidation method[5] has been studied using varying amounts of oxidant (1–5 Mol). The products of these oxidations were analysed quantitatively using the iodometric reduction method of Toennies and Lavine[4] and also qualitatively by the combination of paper electrophoresis and paper chromatography[13]. The reaction course is found to be markedly affected by the presence of HCl, presumably because the effective oxidant in this case is chlorine, formed *in situ*. In the presence of HCl large amounts of the two intermediate oxidation products III and VI are formed[18] whereas in the absence of HCl the final oxidation stage cysteic acid (VII), is reached with only minor amounts of III and VI; and VII is the ultimate product when excess of performic acid is used either in the presence or absence of HCl. It is noteworthy that there is no evidence for intermediates other than III and VI whereas the whole range of products from R–S–SO–R to R–SO_2–SO_2–R can be prepared in the simple aliphatic and aromatic series[19,20]. Recent work has shown that although apparently simple, the oxidation of thiols to disulfides[21] and of thiolsulfinates to thiolsulfonates[22] may involve complex reaction mechanisms[23].

Zusammenfassung. Die früher als «Cystinmonosulfoxyd» beschriebene Verbindung (Thiosulfinat II) verhält sich wie eine äquimolekulare Mischung von Cystin (I) und dem entsprechenden Thiosulfonat (III). Oxydation von Cystin mit Perameisensäure führt, besonders in Gegenwart von HCl, über die Zwischenprodukte Thiosulfonat (III) und Sulfinsäure (VI) zu Cysteinsäure (VII).

J. A. Maclaren

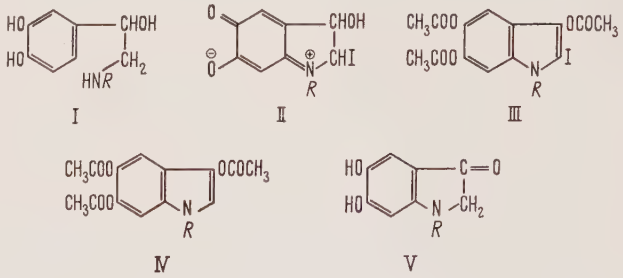
Division of Protein Chemistry, C.S.I.R.O. Wool Research Laboratories, Parkville-Melbourne (Victoria, Australia), May 15, 1961.

[14] W. Stricks, I. M. Kolthoff, and N. Tanaka, Analyt. Chem. *26*, 299 (1954).
[15] Kindly determined by Dr. W. F. Forbes of this laboratory using an IR 7 Beckman spectrophotometer.
[16] H. J. Backer and H. Kloosterziel, Rec. Trav. chim. Pays-Bas *73*, 129 (1954).
[17] A. Schöberl and H. Gräfje, Proc. Int. Wool Text. Res. Conf. Aust. 1955 *C*, 157 (1956).
[18] Separate studies showed that VI may be an indirect product formed by hydrolysis of III.
[19] H. Bredereck, A. Wagner, H. Beck, and R. J. Klein, Chem. Ber. *93*, 2736 (1960).
[20] For a recent review see Houben-Weyl, *Methoden der Organischen Chemie*, 4. Aufl., vol. 9 (Georg Thieme, Stuttgart 1955).
[21] G. Toennies and J. J. Kolb, Nature (Lond.) *177*, 281 (1956).
[22] D. Barnard and E. J. Percy, Chem. and Ind. *1960*, 1332.
[23] Grateful acknowledgements are due to Dr. G. E. Utzinger for a sample of the 'monosulfoxide' for comparison purposes.

Noradrenolutin

It has been known for many years that fluorescent substances can be obtained from the oxidation products of adrenaline (I: $R = CH_3$) and noradrenaline (I: $R = H$) by treatment with alkali and this phenomenon has been widely used in the fluorometric estimation of these catecholamines in body fluids (for references see Heacock[1], von Euler[2], and Perskey[3]). The fluorescent derivative of adrenaline, known as adrenolutin (5,6-dihydroxy-N-methylindoxyl (V: $R = CH_3$))[4] was isolated and characterized several years ago[6]; however isolation of the fluorescent oxidation product of noradrenaline in the solid state has not yet been reported. Bu'Lock and Harley-Mason failed to obtain any crystalline material from the alkaline rearrangement products of solutions of noradrenaline, which had been oxidized with potassium ferricyanide[7]. An alternative unsuccessful route attempted by these authors[7] has been reexamined and crystalline noradrenolutin (i.e. 5,6-dihydroxyindoxyl (V: $R = H$)) has now been obtained.

2-Iodonoradrenochrome (II: $R = H$) can be obtained from the oxidation of noradrenaline hydrochloride with potassium iodate[7,8]. (The procedure described by Bu'Lock and Harley-Mason gives a poor yield of crystalline product and only after removal of much tarry material[7].) However, a moderate yield of crystalline 2-iodonoradrenochrome with minimal formation of tarry



[1] R. A. Heacock, Chem. Revs. *59*, 181 (1959).
[2] U. S. von Euler, *Noradrenaline-Chemistry, Physiology, Pharmacology and Clinical Aspects* (Charles C. Thomas, Springfield, Ill. 1956).
[3] H. Perskey, Methods of biochem. Anal. *2*, 57 (1955).
[4] In much of the earlier literature, adrenolutin is usually formulated as a trihydroxyindole, i.e. 3,5,6-trihydroxy-N-methylindole, but recent infrared studies have indicated that in the solid state, at least, it exists in the keto form, i.e. 2,3-dihydro-5,6-dihydroxy-3-keto-N-methylindole[5].
[5] R. A. Heacock and M. E. Mahon, Can. J. Chem. *36*, 1550 (1958).
[6] A. Lund, Acta pharmacol. toxicol. *5*, 75, 121 (1949).
[7] J. Bu'Lock and J. Harley-Mason, J. chem. Soc. *1951*, 712.
[8] R. Barer, H. Blaschko, and H. Langeman, J. Physiol. *112*, 21P (1951).

byproducts was obtained by treating a solution of noradrenaline hydrochloride (0.5 g) in water (150 ml) with potassium iodate (0.8 g); stirring the reaction mixture for $1^1/_2$ h; adjusting the pH to 2 (with hydrochloric acid) and finally allowing the solution to stand at 4° overnight. Direct acetylation of 2-iodonoradrenochrome (II: $R = H$) with acetic anhydride and dry pyridine gave 3,5,6-triacetoxy-2-iodoindole (III: $R = H$) (m.p. 207–208°) (Found: C, 40.32; H, 2.92; N, 3.14; I, 30.53. $C_{14}H_{12}O_6NI$ requires C, 40.30; H, 2.89; N, 3.36; I, 30.43%) which on deiodination with zinc and acetic acid gave 3,5,6-triacetoxyindole (IV: $R = H$) (m. p. 123–124°) (Found: C, 57.79; H, 4.53; N, 4.81. $C_{14}H_{13}O_6N$ requires C, 57.73; H, 4.50; N, 4.82%). These two compounds had previously been described as 3,5,6-triacetoxy-N-acetyl-2-iodoindole (III: $R = COCH_3$) and 3,5,6-triacetoxy-N-acetylindole (IV: $R = COCH_3$) respectively[7], however identification was based on carbon and hydrogen analysis alone, which in these cases does not give a sufficiently clear cut differentiation between the tri- and tetra-acetyl derivatives. In neither case does the infrared spectrum show any amide carbonyl bands, however both show definite N-H stretching peaks[9] at 3450 cm^{-1} and 3470 cm^{-1} respectively. BU'LOCK and HARLEY-MASON failed to obtain any crystalline fluorescent product from the alkaline hydrolysis of the deiodinated acetyl derivative[7], however, hydrolysis of 3,5,6-triacetoxyindole with 1 *N* sodium hydroxide in the presence of a small quantity of sodium hydrosulphite gave, in our hands, after acidification with glacial acetic acid, a yellow-orange solid, which afforded noradrenolutin (5,6-dihydroxyindoxyl, V: $R = H$) in bright yellow needles (m.p.—totally decomposed by 248°) on recrystallization from hot water (containing a small quantity of sodium hydrosulphite). (Found: C, 58.43; H, 4.49; N, 8.48. $C_8H_7O_3N$ requires C, 58.18; H, 4.27; N, 8.48%). No crystalline product could be isolated when the hydrolysis was carried out in the absence of sodium hydrosulphite[7]. Noradrenolutin obtained by the method described above dissolves in water or methanol to give intensely fluorescent solutions. The ultraviolet and visible absorption spectra were measured in water (λ_{max}: 248; 284; 315; 368 mμ). The fluorescence characteristics[10] of noradrenolutin were also measured in aqueous solution and showed that maximum fluorescence apparently occurred at 490–500 mμ with excitation at 380–390 mμ.

These studies which form part of a comprehensive study of the chemistry of aminochromes are continuing and further details will be published elsewhere.

Zusammenfassung. Herstellung und einige Eigenschaften von kristallinem Noradrenolutin (5,6-Dioxyindoxyl), dem gelbgrün fluoreszierenden Oxydationsprodukt von Noradrenalin, werden beschrieben.

R. A. HEACOCK and B. D. SCOTT

Psychiatric Research Unit, University Hospital, Saskatoon (Saskatchewan, Canada), May 15, 1961.

[9] The infrared spectra were measured in chloroform solution.

[10] Measured on an Aminco-Bowman spectrophotofluorometer, through the courtesy of Dr. V. WOODFORD.

Uncoupling of Oxidative Phosphorylation in Antigen-Antibody Reactions

It is now an accepted fact that cells are damaged by antigen-antibody reactions, probably by intervention of complement.

Although the exact mechanism by which the damage is produced is so far unknown, we can infer, from indirect data and by comparison with the phenomena observed in sensitized erythrocites, that the lesion begins in the cell membrane.

It is usually accepted that blood vessel endothelia and mesenchymal cells are the site of the antigen-antibody reaction; parenchymal injury is thought to be secondary, caused by toxic substances liberated by the cells at the site of reaction. Numerous data bear out this hypothesis, but one cannot entirely reject the possibility that parenchymal cells may be site of antigen-antibody reaction, either in abnormal conditions or because the antigen, having first been modified by the cells of the reticuloendothelial system, then passes into the cells of the parenchyma.

It is not known which cellular structures take part in the antigen-antibody reaction, nor whether it takes place at the cell surface or inside the cell itself. It seems logical to suppose that the antigen penetrates into those cells which produce the antibodies, as this is the only way protein syntheses may be stimulated and directed according to the chemical structure of the antigen; it is also possible that the antigen may be adsorbed at the surface of cells which are not directly involved in antibody production. The fact that lesions in serum sickness begin as soon as antibodies appear in the blood stream (HAWN and JANEWAY[1]; GERMUTH[2]; GERMUTH, PACE, and TIPPETT[3]) while the antigen is still present, is in accordance with this hypothesis. Adsorption of the antigen at the cell surface and its subsequent binding to the antibody appears therefore to be the damaging factor of cell structures.

In this study I have considered oxidative phosphorylation, which is a most precise and sensitive index of the function and structure of mitochondria, which are concerned with some of the most important aspects of cellular life.

Investigations were carried out in three directions, i.e.: (1) Action of specific antiserum on oxidative phosphorylation in mitochondria obtained at various intervals from animals injected with corresponding antigen. (2) Influence of the antigen-antibody complex on oxidative phosphorylation after removal of the precipitate. (3) Behaviour of oxidative phosphorylation in mitochondria after antigen adsorption and subsequent treatment with corresponding serum.

Methods. Animals: Albino rats weighing on the average 100–120 g were used. The rats were fed on a standard diet and were killed by decapitation.

Isolation of mitochondria: Mitochondria were obtained by centrifugation (Servall SSI centrifuge) from 10% homogenate of liver and kidney prepared in a cold room at + 2°C with 0.25 *M* sucrose and 0.02 *M* Tris-HCl buffer pH 7.4. The mitochondrial sediment was then resuspended in 0.25 *M* sucrose and 0.02 *M* Tris buffer. The system used for the study of oxidative phosphorylation consisted of: 0.013 *M* Na_2HPO_4-KH_2PO_4 pH 7.4; 0.01 *M* Tris buffer pH 7.4; 0.005 *M* $MgCl_2$; 0.01 *M* KCl; 0.00001 *M* $MnCl_2$; 0.02 *M* ATP; 0.02 *M* KF; 0.02 *M* glucose; 0.03 *M* sucrose;

[1] Z. VAN HAWN and C. A. JANEWAY, J. exp. Med. *97*, 257 (1953).

[2] F. G. GERMUTH, J. exp. Med. *97*, 257 (1953).

[3] F. G. GERMUTH, M. G. PACE, and J. C. TIPPETT, J. exp. Med. *101*, 135 (1955).

0.00001 *M* cytochrome; 0.01 *M* K glutamate; 0.03 *M* yeast hexokinase (Sigma's Type II) and mitochondria corresponding to 100 mg fresh tissue.

Preparation of immune serum. Crystalline albumine prepared from horse serum (kindly provided by I. V. Toscano Sclavo) was used as antigen. Immune serum was obtained from rabbits, following injection of 350 mg albumin, divided into five subcutaneous injections which were given in the course of one month. Ten days after the last injection, the precipitin titer of the serum was determined by the zone reaction, which was positive at a maximum antigen dilution of 0.001 to 10 ml saline.

Experimental. (1) *In vivo:* 10 albino rats were each injected with 2 mg crystalline albumin diluted in 1 ml saline. They were then killed 2, 6, 12, 24 h and 2 days after injection. Mitochondria were prepared from liver and kidney. 0.20 ml anti-albumin-serum were added to them in the experimental conditions described for the study of oxidative phosphorylation. The aim of this investigation was to see whether the injected antigen was fixed by mitochondria and whether the added antibody would react with it, thereby uncoupling the P:O ratio.

(2) *In vitro:* 0.50 ml of antialbumin serum was added to 10 mg albumin dissolved in 2 ml 0.88% NaCl. The mixture was incubated for 1 h at 37°C. The resulting precipitate was then removed by high speed centrifugation (30 min at 20000 Xg Servall SSI) 0.5 ml of the supernatant was added to mitochondria suspension. The aim of this investigation was to see whether a toxic substance capable of modifying the P:O ratio was produced by the antigen-antibody reaction.

(3) *In vitro:* mitochondria obtained from 1 g rat liver and kidney were washed in 0.25 *M* sucrose containing 3% crystalline albumin. The mitochondria were suspended in a suitable medium and mixed with anti-albumin serum, with and without the addition of complement. The aim of this investigation was to see whether the antigen was adsorbed on mitochondria surfaces and whether the specific immune serum caused the uncoupling of the P:O rate by reacting with it.

The results are shown in the Tables and point out that mitochondria of animals injected at various times with horse albumin do not show any appreciable modification of oxidative phosphorylation when mixed with their respective antibody. The most plausible explanation is that the antigen has not come into contact with the antibody, either because it is not present in mitochondria or because it is not in a suitable form to react. It is very likely that cell and mitochondrial membrane permeability to protein molecules is involved in the phenomenon.

Tab. I. Oxidative phosphorylation in rat mitochondria. The animals were injected with 2 mg albumin and were killed after variyng intervals. Liver and kidney mitochondria were mixed with 0.20 ml anti-albumin serum.

No. Exp.	Mitochondria isolated from	Time after injection	P:O rate
1	liver	$^1/_2$ h	2.87
2	liver	2 h	2.70
3	liver	24 h	2.40
4	kidney	2 h	2.10
5	kidney	24 h	2.90
6	kidney	48 h	3.10

Tab. II. Oxidative phosphorylation in rat mitochondria after addition *in vitro* of 0.50 ml antigen-antibody solution after removal of precipitate.

No. Exp.	1	2	3	4	5
Mitochondria isolated from	liver	liver	liver	liver	liver
P:O rate	2.40	2.20	2.70	2.85	2.45

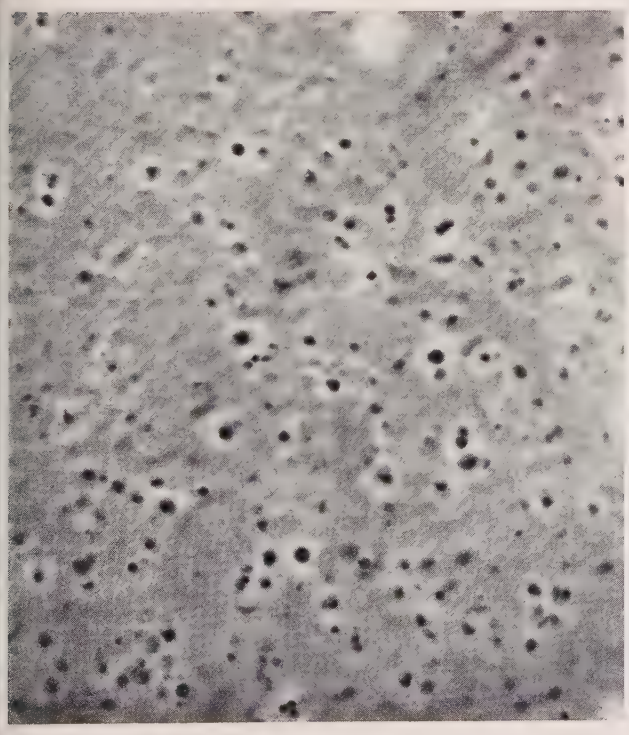


Fig. 1. Mitochondria from normal rat liver suspended in 0.25 *M* sucrose containing 3% crystalline horse serum albumin.

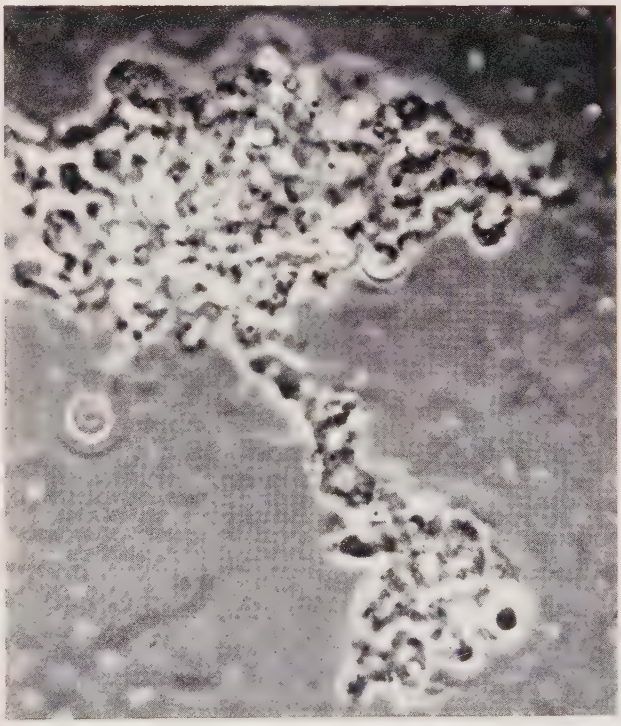


Fig. 2. The same mitochondria as in Figure 1, after addition of the specific anti-albumin serum.

The antigen-antibody complex plays no part in oxidative phosphorylation once the precipitate has been removed. On the contrary, as shown by Table III, mitochondria which have adsorbed the albumin antigen and are then mixed with their respective antibody show a clear uncoupling of phosphorylations from oxidations, which seems to be enhanced by the addition of complement.

Mitochondria clearly show a high adsorbing power towards a heterologous protein such as horse serum albumin; the antigen is fixed by them even after washing with 0.25 *M* sucrose. The mitochondrial membrane is obviously damaged by the antigen-antibody reaction, as shown by the swelling, agglutination (Fig. 1 and 2) and by uncoupling of the P:O rate.

Riassunto. Mitocondri di fegato e rene di ratto adsorbono l'albumina del siero di cavallo; facendo agire su questi in secondo tempo l'immunsiero specifico antialbumina, i mitocondri presentano: agglutinazione, rigonfiamento e dissociazione delle fosforilazioni dalle ossidazioni. L'autore mette in rilievo che la reazione antigene-anticorpo al livello mitocondriale, ne danneggia gravemente la struttura e la funzione.

Tab. III. Oxidative phosphorylation in mitochondria after ad sorption of antigen, subsequently mixed with specific antibody

No. Exp.	Mitochondria isolated from	Additions	P:O rati
1	liver	0.2 ml immun serum	1.1
2	liver	0.2 ml immun serum	1.80
3	liver	0.2 ml immun serum	1.25
4	liver	0.2 ml immun serum	1.40
5	liver	0.2 ml immun serum + 0.1 complement	0.50
6	liver	0.2 ml immun serum + 0.1 complement	0.53
7	liver	0.2 ml immun serum + 0.1 complement	0.35
8	liver	0.2 ml normal serum	2
9	liver	0.2 ml normal serum	2.69
10	liver	0.2 ml normal serum	2.09
11	liver	0.2 ml normal serum	2.25
12	liver	0.2 ml normal serum + 0.1 complement	2.20
13	liver	0.2 ml normal serum + 0.1 complement	1.85

L. MICHELAZZ

Department of General Pathology, University of Genova (Italy), April 4, 1961.

Nachbargruppeneffekt des Pyridinringes beschleunigt alkalische Ester-Hydrolyse

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Wirkungsweise von PAM (Pyridin-2-aldoxim-methojodid) war es notwendig, das reaktive Verhalten von Pyridinanalogen Cholinestern bei der alkalischen Hydrolyse kennenzulernen. Durch potentiometrische Titration bei konstantem pH[1] fanden wir, dass der Benzoesäureester I von 2-Hydroxymethyl-N-methylpyridiniumchlorid mit OH^--Ionen mehr als doppelt so schnell reagiert als der «aktivierte Ester»[2] Benzoylcholin II (vergleiche Tabelle I). Dieses Resultat schien zunächst überraschend; es wäre nämlich zu erwarten gewesen, dass sich der elektrostatische Effekt[2] beim Cholinester stärker auswirkt als bei I, weil wegen der vielseitigen Resonanzmöglichkeiten im N-Alkyl-pyridiniumsystem[3] die positive Ladung am Stickstoff teilweise intramolekular kompensiert ist. Der elektrostatische Effekt allein vermag also die gefundenen Tatsachen nicht zu deuten. Berücksichtigt man jedoch ausserdem, dass der Pyridinium-Ester, nicht aber der Cholinester zur nucleophilen Addition von Anionen befähigt ist[4], so kommt man zu einer befriedigenden Erklärung. Wir nehmen an (vergleiche Figur 2), dass zunächst die Ester-Carbonylgruppe von der positiven Ladung angezogen und in räumliche Nachbarschaft zum Stickstoff gebracht wird (III) (elektrostatischer Effekt); dadurch wird die Polarisation der C=O-Gruppe noch verstärkt und der Angriff durch das OH^--Ion erleichtert. Gleichzeitig erfolgt intramolekulare Addition des Carbonylsauerstoffs

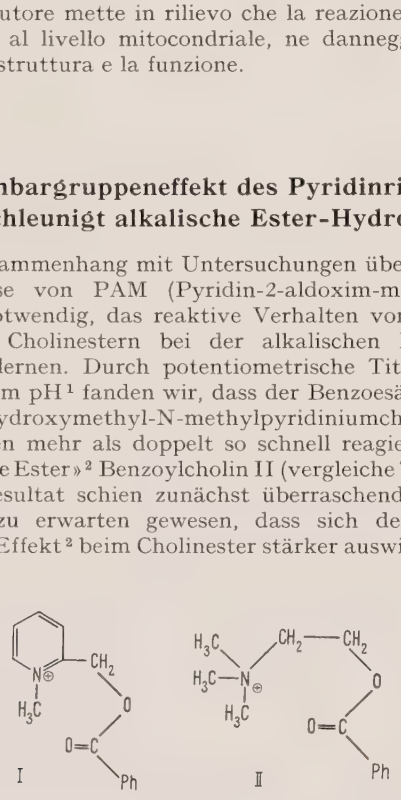


Fig. 1

Tab. I

Versuch Nr.		1	2	3	4
		$k_1 \cdot 10^2$ (min^{-1})			
Ester	I	10,74	9,47	9,81	11,60
	II	3,24	3,43	3,65	3,18

pH: 11,00 ± 0,03; Temperatur: 19,6°; c_0 = 0,025 Mol/l (Anfangskonzentration des Esters in bidest. Wasser); Ionenstärke p = 0,5 Mol/l NaCl. Aus dem Verlauf der Titrationskurven wurde nach dem zweiten (halbgraphischen) Verfahren von GUGGENHEIM[8] die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung k_1 ermittelt.

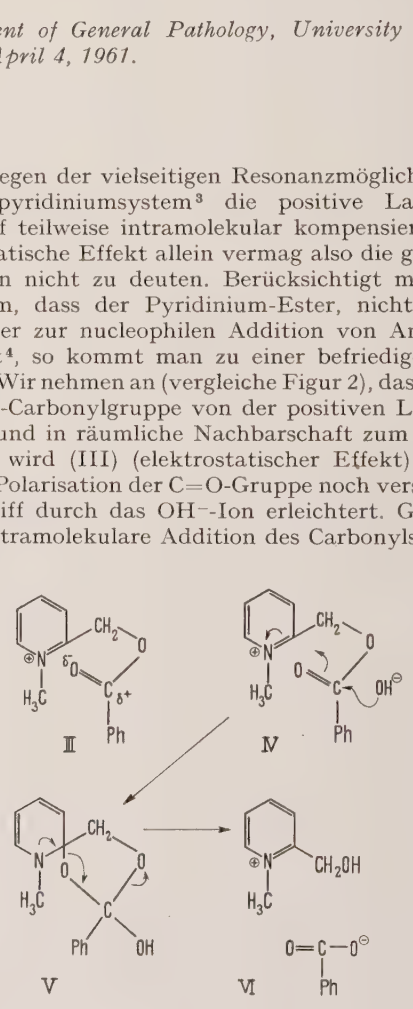


Fig. 2

[1] Zur pH-Stat-Methodik vgl. C. F. JACOBSEN, J. LÉONIS, K. LINDERSTRÖM-LANG und M. OTTESEN, Methods of Biochemical Analysis *4*, 171 (1957).

[2] E. SCHÄTZLE, M. ROTTENBERG und M. THÜRKAUF, Helv. chim. Acta *42*, 1708 (1959).

[3] F. KRÖHNKE, Angew. Chem. *65*, 605 (1953).

[4] Vgl. die ausführliche Arbeit von K. WALLENFELS und H. SCHÜLY, Liebigs Ann. *621*, 86 (1959).

an den Pyridinkern (IV). Das äusserst kurzlebige[5], spirocyclische BENDER-Zwischenprodukt (V) stabilisiert sich jetzt unter Rückbildung des Pyridin-Systems zu den Endprodukten, Benzoesäure und Hydroxymethyl-N-methylpyridiniumchlorid (VI).

Präparative Durchführung der alkalischen Hydrolyse in $H_2{}^{18}O$-haltigem Wasser ergab die vom skizzierten Mechanismus geforderte, normale Isotopenverteilung; in der isolierten Benzoesäure findet man durch Decarboxylierung des Silbersalzes[2] und massenspektrometrische Analyse des CO_2 die Hälfte des im $H_2{}^{18}O$ enthaltenen schweren Sauerstoffs (vergleiche Tabelle II). Die Ähnlichkeit dieser Esterspaltung mit der kürzlich entdeckten oxydativ-bromierenden Hydrolyse von Tyrosin- und Tryptophan-Peptiden[6,7], unter Beteiligung des desaromatisierten Ringsystems, ist augenfällig.

Tab. II. 2-Benzoyloxymethyl-N-methyl-pyridiniumchlorid (I), alkalische Hydrolyse in $H_2{}^{18}O$ bei Zimmertemperatur, 22 und 70 h. Ansatz: 1 mMol Ester + 10 ml 0,1-*n* NaOH–O^{18} (1,09% ^{18}O); CO_2 aus Bombe: 0,207% ^{18}O.

Versuch Nr.	1	2	3	4
h	22	22	70	70
Silbersalz, mg	138	137	142	112
% ^{18}O	0,51	0,50	0,54	0,53

Substrate: 1. Benzoylcholin-chlorid, bezogen von Hoffmann-La Roche. 2. Pyridyl-2-carbinylbenzoat-methochlorid (I). Aus Pyridyl-2-carbinylbenzoat-hydrochlorid (Ia; F. 134–136°, unkorr.) erhielt man das Methojodid (Ib; F. 185–186°, unkorr.), und durch Ionen-Austausch schliesslich das Chlorid I (F. unscharf, Zers. bei ca. 180°); für Ia und I liegen gut stimmende CH, N- und Halogen-Analysen vor.

Summary. A structural analogue of benzoylcholine is prepared in which the trimethylamino group is replaced by a pyridine ring. Rate measurements are presented to demonstrate that the pyridinium ester I undergoes alkaline hydrolysis faster than the choline ester II. It is suggested that the abnormal rate is due to an unusual type of neighbouring group effect involving anchimeric participation of the pyridine ring.

ELSBETH SCHÄTZLE, H. URHEIM,
M. ROTTENBERG und M. THÜRKAUF[9]

KTA, Laboratorium Wimmis (Bern), und Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel, 10. März 1961.

[5] M. L. BENDER, J. Amer. chem. Soc. *73*, 1626 (1951).
[6] E. J. COREY und L. F. HAEFELE, J. Amer. chem. Soc. *81*, 2225 (1959). – G. L. SCHMIR, L. A. COHEN und B. WITKOP, J. Amer. chem. Soc. *81*, 2228 (1959).
[7] W. B. LAWSON, A. PATCHORNIK und B. WITKOP, J. Amer. chem. Soc. *82*, 5918 (1960). – A. PATCHORNIK, W. B. LAWSON, E. GROSS und B. WITKOP, J. Amer. chem. Soc. *82*, 5923 (1960).
[8] E. A. GUGGENHEIM, Phil. Mag. [7] *2*, 538 (1926).
[9] Der eine von uns (M. TH.) ist der Schweiz. Kommission für Atomwissenschaft (KAW) zu Dank verpflichtet. Das verwendete $H_2{}^{18}O$ wurde mit Hilfe von Präzisions-Destillierkolonnen gewonnen, welche im Rahmen eines Forschungsprogrammes der SKA (Schweiz. Kommission für Atomenergie) entwickelt und in früheren Arbeiten beschrieben wurde[10]. Herrn ERNST WENGER danken wir für zuverlässige Mitarbeit beim Messen und Rechnen.
[10] W. KUHN, Chem. Ing. Techn. *1957*, 6. – P. BAERTSCHI und W. KUHN, Techn. Rundschau *1954*, Nr. 52.

Observations on the Fate of Oral 4-Hydroxytryptophan in Man[1]

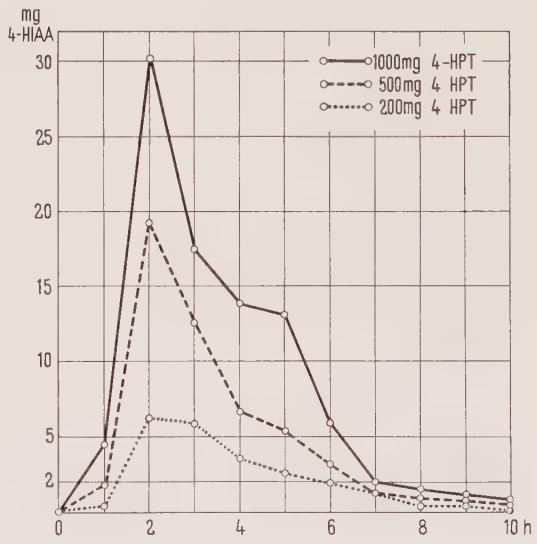
It is known that 4-hydroxytryptophan (4-HTP) is an excellent substrate for mammalian dopadecarboxylase[2]. The urine of rats given 4-HTP, by oral or subcutaneous route, contains a number of 4-HTP metabolites, among which are 4-hydroxytryptamine (4-HT), 4-hydroxyindoleacetic acid (4-HIAA), and their O-glucuronides[3].

This communication is intended to give a concise account of the fate of 4-HTP given by mouth in man. Three doses of 200, 500, and 1000 mg of *DL*-4-HTP, dissolved in a little water, were ingested by one of us (E.) at intervals of 7 days. Urine was collected and measured every hour for 12 h, and then in the following 12 h period.

Chromatograms of suitably concentrated or diluted urine were run, using prevalently the *n*-butanol : acetic acid : water mixture (4:1:5) and 4-hydroxyindole spots were developed with the NNCD reagent (2-chloro-4-nitro-1-diazobenzene-α-naphtalene sulphuric acid) or with diazotized *p*-nitroaniline. Semi-quantitative estimation of 4-HTP and 4-HIAA was carried out on paper chromatograms by visual comparison of the spots given by different amounts of urine with the spots given by known amounts of pure synthetic 4-HTP or 4-HIAA. 4-HT was estimated, both by paper chromatography and by bioassay.

In order better to separate and individualize the 4-HTP metabolites, pooled urine was passed through an alumina column and eluted with descending concentrations of ethanol.

The main results may be summarized as follows: (a) oral *DL*-4-HTP, in doses up to 1 g, had no obvious pharmacological effects in man. (b) 4-HIAA was by far the most important metabolite of 4-HTP found in urine after the oral administration of the amino acid. The total amount of free 4-HIAA was 95–100 mg after 1000 mg



Urinary excretion of 4-HIAA after oral administration, at 0 time, of 200, 500, and 1000 mg of *DL*-5-HTP.

[1] Supported by a grant from the Rockefeller Foundation, New York.
[2] V. ERSPAMER, A. GLÄSSER, C. PASINI, and G. STOPPANI, Nature *189*, 483 (1961).
[3] V. ERSPAMER, A. GLÄSSER, M. B. NOBILI, and C. PASINI, Exper. *16*, 506 (1960).

DL-4-HTP, 53–55 mg after 500 mg *DL*-4-HTP, and 22–24 mg after 200 mg *DL*-4-HTP. The excretion curve of 4-HIAA in urine is shown in the accompanying Figure. (c) Only a very small aliquot (1.3–2.2%) of the administered amino acid was recovered unchanged in the urine, and less than 1% as 4-HT. This is in contrast with the relatively high amounts of 4-HT found in rat urine under similar experimental conditions. The presence of *O*-glucuronides of 4-HTP, 4-HT, and 4-HIAA, as well as of the *O*-sulphate of 4-HT, is questionable. (d) In addition to the above metabolites, human urine contained large amounts of another important 4-HTP metabolite, possibly an acid conjugate, the identification of which is in progress.

The above results suggest that oral 4-HTP and the 4-HT originating from it are already metabolized to a great extent in the intestinal wall and in the liver. Very little 4-HTP seems to be available for the renal decarboxylase, as shown by the small amount of 4-HT found in urine[4].

Riassunto. È stato studiato nell'uomo il destino del 4-idrossitriptofano (4-HTP) somministrato per bocca. Fra i metaboliti urinari dell'aminoacido quello di gran lunga più importante è risultato l'acido 4-idrossiindolacetico (10–12% riferito al *DL*-4-HTP). Scarsa è stata l'eliminazione urinaria di 4-HTP inalterato (1,3–2,2%) e ancora più scarsa quella della 4-idrossitriptamina (meno dell'1%). Un ulteriore importante metabolita del 4-HTP, presumibilmente un coniugato acido, è in corso di identificazione.

V. ERSPAMER and M. B. NOBILI

Istituto di Farmacologia, Università di Parma (Italy), April 28, 1961.

[4] The 4-hydroxyindoles used in the present investigation were synthetized at the Farmitalia S.p.A. Research Laboratories, Milan, by Dr. C. PASINI and Dr. V. COLÒ.

Rat Serum *para*-Phenylene Diamine Oxidase Reaction During Azo Dye Carcinogenesis

NEISH[1] reported that the *para*-phenylene diamine oxidase (copper oxidase) activity of rat serum, as evaluated by the method of RAVIN[2], was greatly diminished for a period of four days after injections of the strong hepatocarcinogens 3′-methyl and 4′-ethyl-dimethylaminoazobenzene (3′-MeDMAAB and 4′-et-DMAAB). The feeble carcinogen 4′-MeDMAAB did not have this effect and injection of 16 mg/100 g rat in 0.6 ml arachis oil caused an increase over a 2–4 day period. He also showed that the injection of powerful carcinogenic azo dyes greatly reduced the copper levels in the rat serum after 72 h. From a further study NEISH[3] concluded that any compound which is found to suppress the copper oxidase under the experimental conditions described may be suspect as a potential liver carcinogen.

In our laboratory HOWELL[4] showed that feeding copper acetate to rats (6 mg/day in the cancer-inducing diet containing DMAAB) greatly inhibited the production of liver tumours. Because of the relevance of this finding to the work of NEISH we have conducted experiments on the effects of long-term feeding of the dye and copper acetate, separately and in combination, on the serum copper oxidase, and also on the effects of administering the primary metabolic products, viz; monomethylaminazobenzene and aminoazobenzene, and of the further metabolites, *p*-aminophenol and *p*-phenylene diamine.

Preliminary tests confirmed NEISH's observations on the effects of azo dye injection in arachis oil.

During the course of these investigations it was observed that the enzyme reaction was very sensitive to the concentration of acetate in the buffer. Thus, at constant pH 5.5, a change in the concentration of the sodium acetate from 4.15% to 0.95% resulted in the decrease of the optical density from 0.43 to 0.21 at 530 mμ, although an alteration in the pH with this buffer system from pH 6.1 to 5.1 made practically no difference to the enzyme activity. It was important, therefore, in the long term experiments to check the properties of new buffer solutions against the existing stock.

Long term azo dye feeding tests. In one experiment 3 groups of 5 rats were employed. One group was fed a basic maize diet similar to that utilized by HOWELL[4], the second group was fed DMAAB, 6 mg/day in this diet, and the third group was given the same amount of dye with the addition of 6 mg copper acetate/day. A careful check on the daily consumption of the food, and periodic weighing of the animals, which were 120–160 g weight initially, demonstrated that the chemicals were satisfactorily consumed and that there was no undue inhibition of the growth of the animals, all of which survived more than 20 weeks.

It was found that after one week, and thereafter over the whole period, the serum oxidase values were consistently lower in the dye-fed group than in the control maize-fed animals and that the copper acetate opposed the effect of the carcinogenic dye on the oxidase so that the enzyme values were near normal. The results are given in Figure 1, where the levels of the oxidase above or below the values prior to the dye feeding are expressed in arbitrary units derived from the optical density of the coloured solutions estimated at 530 mμ as described by NEISH. These values are the averages for 5 animals in each group at intervals of 4 weeks but the effects were regularly found in every individual animal of the experimental groups.

In a second experiment three groups of 5 rats were fed NN-dimethylaminoazobenzene (DMAAB), the N-methyl derivative and *p*-aminoazobenzene, respectively. The results are shown in Figure 2 from which it is evident that the monomethyl compound, which is regarded as similar in carcinogenicity to the dimethyl compound, also produced lower values in the serum oxidase reaction during the whole period, while the effect of the non-methylated, non-carcinogenic compound was much less marked.

From experiments in which DMAAB was fed to rats along with a second azo dye, which inhibited the cancer producing effect of the butter yellow, CRABTREE[5] concluded that this was attributable to the metabolic production of *p*-aminoazobenzoic acid in the liver by breakdown of the second dye. He pointed out that *p*-aminobenzoic acid itself did not inhibit azo dye carcinogenesis but that azo dyes capable of forming *p*-toluidine or *p*-aminobenzoic acid were inhibitory.

It was thus of interest to see whether these two compounds would inhibit the serum oxidase. They were given

[1] W. J. P. NEISH, Exper. *14*, 287 (1958).
[2] H. A. RAVIN, Lancet *1956*, 726.
[3] W. J. P. NEISH, Exper. *15*, 20 (1959).
[4] J. S. HOWELL, Brit. J. Cancer *12*, 594 (1958).
[5] H. G. CRABTREE, Brit. J. Cancer *9*, 310 (1955).

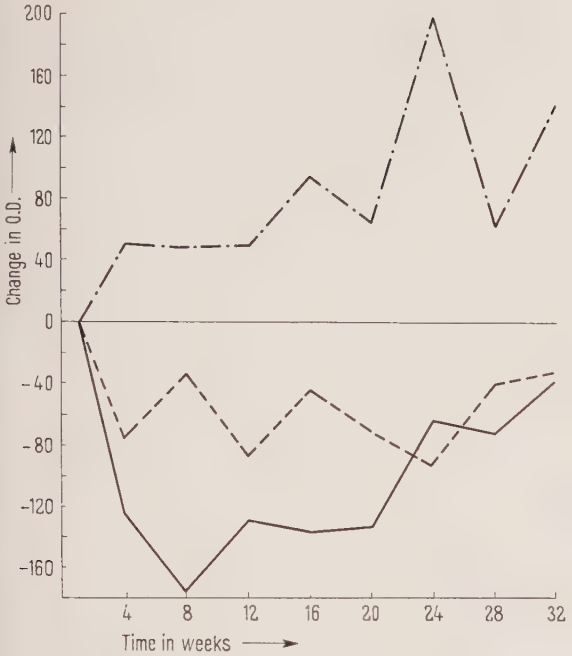


Fig. 1. Phenylene diamine oxidase: changes in rat serum during dietary treatment with DMAAB (——), DMAAB + CuAc (----). Compared with basic maize diet (-·-·-). (Average of 5 rats.)

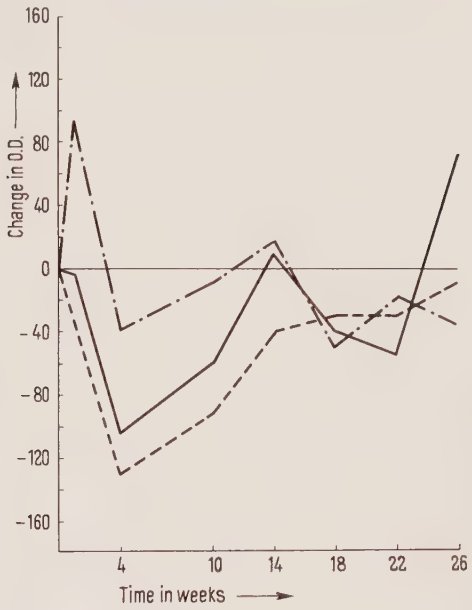


Fig. 2. Phenylene diamine oxidase: changes in rat serum during dietary treatment with DMAAB (——), N-methyl AAB (----), AAB (-·-·-). (Average of 5 rats.)

0.04% in the food to groups of 5 rats along with the DMAAB. Blood assays were carried out before commencing the dye feeding and after 1 and 4 weeks. The oxidase values were significantly lower after one week and considerably decreased after four weeks to as great an extent as was produced by giving the carcinogenic dye only. Thus the cancer-inhibiting action of these dye metabolites does not appear to be associated with systems connected with copper oxidase.

Short term tests. Metabolic products of azo dyes. The following metabolites of DMAAB *p*-aminophenol, *p*-phenylene diamine, N-methylaminoazobenzene, and *p*-aminoazobenzene were investigated for their effects using

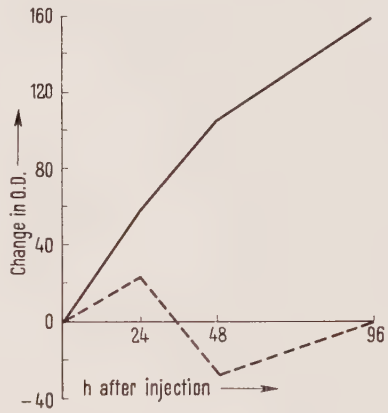


Fig. 3. Effect of single arachis oil injection on rat serum phenylene diamine oxidase 0.6 ml/100 g body weight (——). 0.3 ml/100 g (----). (Average of 2 rats.)

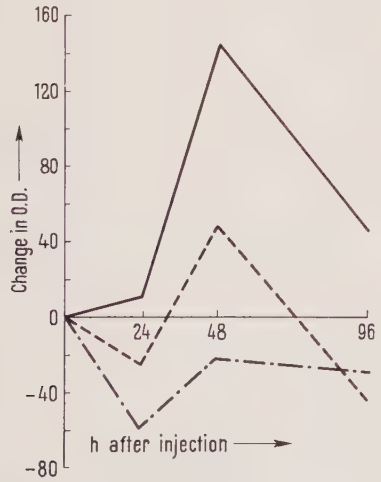


Fig. 4. Effect of sing'e injection of N-methyl AAB (-·-·-) and AAB (----) compared with DMAAB. In arachis oil 0.3 ml/100 g rat body weight. (Average of 2 rats.)

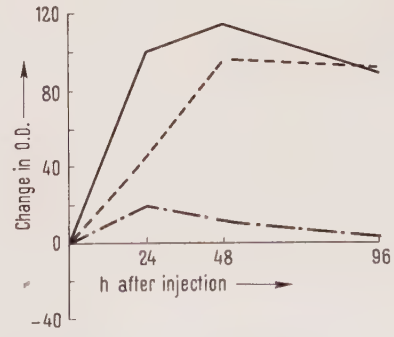


Fig. 5. Effect of single injections of *p*-amino phenol (——). *p*-phenylene diamine (----). In arachis oil 0.3 ml/100 g rat body weight. Aqueous *p*-amino benzoic acid (-·-·-). (Average of 2 rats.)

the injection technique with the slight modification that only 0.3 mg/100 g rat of arachis oil was used as vehicle. It has been noted previously that the injection of this quantity of arachis oil did not produce as great an increase in the serum oxidase values of otherwise untreated animals, as does the amount (0.6 ml/100 g rat) injected by NEISH[1] so that the main effect of the chemical under test could be more accurately assessed (Figure 3). The effect of *p*-aminobenzoic acid was also tested but was given in aqueous solution.

The amounts of the various compounds injection per 100 g rat were: *p*-aminophenol 3.6 mg, *p*-phenylene diamine 4.0 mg, *p*-aminobenzoic acid 1.5 mg, DMAAB (for comparison) 7.8 mg. The results of typical tests are given in the Figures 4 and 5.

It will be noted that N-methylaminoazobenzene caused less depression than DMAAB while *p*-aminoazobenzene induced a temporary depression followed by a marked rise with a subsequent fall to the original value at 96 h. On the whole, *p*-amino phenol and *p*-phenylene diamine caused increased values during the 96 h observation period, and *p*-aminobenzoic acid caused slightly raised values[6].

Résumé. Dans le sérum sanguin, on a constaté une diminution de l'activité de la *p*-phénylènediamine-oxydase pendant l'administration *per os* de diméthylaminoazobenzène. En ajoutant de l'acétate de cuivre dans l'alimentation, l'éffet sur le sérum sanguin est moindre. Le monométhylaminoazobenzène, qui est aussi cancérigène sur le foie, a produit une oxydase réduite, mais la aminoazobenzène non cancérigène n'a provoqué qu'une diminution très peu sensible.

Chez les rats nourris avec de l'acide *p*-aminobenzoïque ou *p*-toluidine additionné d'azoïque, le sérum sanguin a continué d'offrir un pourcentage moindre d'oxydase. Les métabolites des azoïques, *p*-aminophénol et *p*-phénylènediamine, provoquent une augmentation de l'oxydase après injection intra-péritonéale dans l'huile d'arachide.

D. L. WOODHOUSE

Cancer Research Laboratories, Department of Pathology, Medical School, Birmingham (England), December 12, 1960.

[6] These investigations were carried out with the financial support of the Birmingham Branch of the British Empire Cancer Campaign.

Vincanorin und Vincarein, zwei neue Alkaloide aus *Vinca minor* L.

In *Vinca minor* wurden bisher 7 Alkaloide festgestellt[1–9]. Wir haben aus der ganzen Pflanze (Stengel, Blätter und Wurzeln) mit dem von SCHEINDLIN und RUBIN[4] beschriebenen Verfahren zwei neue Alkaloide isoliert. Bei der Chromatographie an Aluminiumoxyd wurde eine mit Äther eluierbare Fraktion erhalten, die beim Einengen ein kristallisiertes Gemisch von Alkaloiden (Fraktion A, 0,015% bezogen auf getrocknete Droge) neben amorpher Mutterlauge (Fraktion B, 0,01%) lieferte. Die Fraktion A zeigte im Papierchromatogramm neben einem Flecken, der Vincamin und Isovincamin entsprach, einen solchen mit kleinerem Rf-Wert (0,37 im System Isobutylalkohol/0,2 *M* KH_2PO_4). Zur präparativen Isolierung wurde die Fraktion A mit Hilfe der Gegenstromverteilung im System Benzol/*n*-Butanol/85% Ameisensäure/McIlvains Puffer pH = 3,5 (Verhältnis 25:5:1:31) zerlegt, wobei das bisher unbekannte Alkaloid *Vincarein* in Form einheitlicher Kristalle (1,5% der Fraktion A) gefasst wurde.

Die Gegenstromverteilung der Fraktion B im System Benzol/0,1 *M* Zitronensäure lieferte neben amorphen Fraktionen ein weiteres neues Alkaloid in kristalliner Form, das wir *Vincanorin* nennen. Das neue Alkaloid unterscheidet sich vom isomeren Vincamin ausser durch den Schmelzpunkt auch im Papierchromatogramm (im selben System, das für die Gegenstromverteilung der Fraktion A verwendet wurde).

In der Tabelle sind die Eigenschaften der beiden Alkaloide zusammengestellt.

Summary. The isolation of two new alkaloids from *Vinca minor* L. (Apocynaceae) is described. Vincarein, $C_{21}H_{24}N_2O_4$, and Vincanorin, $C_{19}H_{22}N_2O$, both probably belong to the group of indol alkaloids.

J. MOKRÝ, I. KOMPIŠ, O. BAUEROVÁ, J. TOMKO und Š. BAUER

Abteilung für Chemie der Naturstoffe des Chemischen Institutes der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Bratislava (Tschechoslowakei), 13. März 1961.

[1] E. S. ZABOLOTNAJA, Trudy Vilara *10*, 29 (1950).
[2] E. SCHLITTLER und A. FURLENMEIER, Helv. chim. Acta *36*, 2017 (1953).
[3] M. PAILER und L. BELOHLAV, Monatsh. der Chem. *85*, 1056 (1954).
[4] S. SCHEINDLIN und N. RUBIN, J. Amer. pharmac. Assoc. *44*, 330 (1955).
[5] M. M. JANOT, XV. Congr. de Chimie pure et appliquée (Zürich 1955).
[6] J. TROJÁNEK, J. HOFFMANNOVÁ, O. ŠTROUF und Z. ČEKAN, Coll. Czechoslovak. Chem. Comm. *24*, 526 (1959).
[7] J. TROJÁNEK, O. ŠTROUF, K. KAVKOVÁ und Z. ČEKAN, Coll. Czechoslovak. Chem. Comm. *25*, 2045 (1960).
[8] J. MOKRÝ und I. KOMPIŠ, I. Konferenz über kardiovaskulär wirkende Stoffe (Somolenice 1959).
[9] Z. ČEKAN, J. TROJÁNEK und E. S. ZABOLOTNAJA, Tetrahedron Letters Nr. 18, 11 (1959).

	Smp.	$[\alpha]_D^{20°}$	UV[a] λ_{max} logε	λ_{inflex} logε	λ_{mix} logε	IR[b] in Nujol	Summenformel	Analysen C ber.	C gef.	H ber.	H gef.	N ber.	N gef.	Salze
Vincarein[c]	205–206°	−28,2±2°	*227*	*286*	*250*	5,71 μ	$C_{21}H_{24}N_2O_4$	68,46	68,70	6,57	6,60	7,60	7,89	Methojodid
	aus Aceton	c = 1,48	4,35	3,66	3,41	5,83 μ								Smp. 221–222°
		$CHCl_3$	*274*											
			3,76											
Vincanorin	201–202,5°	0±2°	*227*		*256*	5,86[d]	$C_{19}H_{22}N_2O$	77,52	77,65	7,53	7,70	9,52	9,51	Perchlorat
	aus Methanol	c = 1,02	4,49		3,41									Smp. 243–245°
		$CHCl_3$	*287*		*292*									
			3,89		3,85									
			294											
			3,87											

[a] Vincarein in Methanol, Vincanorin in Äthanol. [b] C=O-Streckschwingungsgebiet. [c] Mit konz. H_2SO_4 wird schwach gelborange, mit Vanillin in konz. H_2SO_4 gelbe, mit $K_2Cr_2O_7$ in konz. H_2SO_4 rotbraune und mit NH_4VO_3 in konz. H_2SO_4 grünbraune Färbung erhalten; das UV-Spektrum ist typisch für ein Indolderivat. [d] Sechsgliedriges, eventuell offenes Keton, ausserdem deutet eine Bande bei 14,5 μ auf ein 1,2-disubstituiertes Benzolderivat.

Potentiation of the Cancerostatic Effect of 6-Azauridine and 6-Azacytidine with 5-Bis-(2-chloroethyl)aminomethyluracil

Recent clinical tests with 6-azauridine, carried out in this country, indicate that this drug may in some cases bring about remission of leukaemia as well as some degree of regression of certain solid tumours. The dose required to achieve these effects is, however, rather large (100 to 300 mg/kg weight). For this reason we have attempted to potentiate the effect of 6-azauridine by cancerostatics of other types. We have now found that the effect of 6-azauridine, as well as of 6-azacytidine[1], is markedly potentiated by 5-bis-(2-chloroethyl)aminomethyluracil (bis-chloroethylaminothymine, BCEAT), a cytostatic agent recently synthesised in these Laboratories[2].

Results of our experiments on Ehrlich ascitic tumours are summarised in the Tables I and II. The tumours employed are practically insensitive to 6-azauridine. However, when applied in combination with BCEAT the survival time of the experimental animals is increased to as much as twice that of the untreated controls. The superior properties of BCEAT as compared with the widely employed trichloroethylamine hydrochloride (TS-160 Spofa) are clearly evident from Table II. In the case of solid Ehrlich tumours (Table III) potentiation by means of BCEAT appears to be statistically significant in the case of 6-azacytidine but not in the case of 6-azauridine.

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, dass die cancerostatische Wirkung von 6-Azauracil und 6-Azacytidin bei Mäusen durch 5-Bis-(2-chloroethyl)aminomethyluracil signifikant potenziert wird.

Tab. I. Ehrlich tumour (ascitic form). 20×10^6 cells were given i.p., therapy initiated on the day following inoculation, the drugs administered daily i.p. in physiological solution.

	Daily dose mg/kg	Total number of doses	Average survival time	Number of mice
Controls	—	—	12.5	12
Azauridine	250	8	13.3	12
BCEAT[a]	0.25	13	18.3	12
BCEAT and[a] Azauridine	0.25 250	14 14	26.0	11

[a] $P < 0.001$

Tab. II. Ehrlich tumour (ascitic form). 15×10^6 cells i.p., therapy initiated on the day following inoculation, the drugs given daily i.p. in physiological solution.

	Daily dose mg/kg	Total number of doses	Average survival time	Number of mice
Controls	—	—	12.9	13
BCEAT[a]	0.25	14	17.8	10
Trichloroethylamine hydrochloride	0.20[c]	11[d]	13.6	10
Trichloroethylamine[b] hydrochloride and azauridine	0.20 500	11[d] 11	16.8	10
BCEAT and[a] azauridine	0.25 500	14 14	23.2	9

[a] $P < 0.001$. [b] $P < 0.02$. [c] Equimolar with BCEAT. [d] The number of doses could not be increased; the animals began to die on the 11th day.

Tab. III. Ehrlich tumour (solid form). 20×10^6 cells were transplanted s.c., therapy initiated on the fourth day following inoculation, the drugs administered daily i.p. in physiological solution. The mice were killed on the 15th day following transplantation, weighed and the average weight of the tumours for each group determined.

	Daily dose mg/kg	Total number of doses	Average weight of tumour	Average weight of mice on the 15th day after transplantation	Number of mice
Controls	—	—	379	29.4	11
Azacytidine	250	9	345	27.1	10
Azacytidine[a] and BCEAT	250 0.25	9 9	261	24.4	10

[a] $P < 0.05$

F. Šorm and J. Veselý

Czechoslovak Academy of Science, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Prague (Cechoslovakia), February 23, 1961.

[1] F. Šorm, J. Smrt, and V. Černeckij, Exper. *17*, 64 (1961).
[2] J. Farkaš and F. Šorm, Coll. Czech. Chem. Commun. *26*, 893 (1961).

Gonadotrope Wirkung von Spermaextrakten

Nukaryia[1] zeigte, dass durch Spermainjektionen Kastrationsfolgen bei ♂ Ratten teilweise aufgehoben werden können. Fulconis und Chiapponi[2] sowie Vargas[3] zeigten, dass Spermainjektionen die Reifung der Follikel herbeiführen und dass die Veränderungen am Ovar jenen nach Gonadotropinverabreichung gleichen. In einer früheren Arbeit (Churý[4]) konnten wir die oben erwähnten Befunde bestätigen und ferner zeigen, dass auch resorbiertes Sperma ähnlich wirkt. Alle diese Befunde führten uns zur Annahme, dass bestimmte Sperma-Stoffe für die erwähnten Veränderungen verantwortlich sind. Die folgenden Versuche dienten deren Ermittlung.

Als Versuchsmaterial benutzten wir infantile Ratten und Mäuseweibchen, die in 9 Gruppen geteilt wurden (siehe Tabelle).

Gruppe	Zahl der Tiere	Versuchsdaten und Bemerkungen
I	11	Ratten, Spermaextrakt, ges. Menge 2,4 ml
II	8	Ratten, Spermaextrakt, ges. Menge 3,6 ml
III	7	Ratten, Spermaextrakt, inaktiviert, 2,4 ml
IV	15	Ratten, Azetonpräzipitatlösung 2,0 ml
V	17	Mäuse, Spermaextrakt, ges. Menge 1,2 ml
VI	13	Mäuse, Azetonpräzipitatlösung 0,8 ml
VII	9	Ratten, Kontrolltiere, Physiol. Lösung
VIII	10	Mäuse, Kontrolltiere, Physiol. Lösung
IX	10	Ratten, FSH, Kontrolltiere, ges. Menge 0,5–1,0 R.E.

[1] S. Nukaryia, Arch. ges. Physiol. *214*, 697 (1926).
[2] H. Fulconis und L. Chiapponi, Rév. franc. gynécol. *25*, 441 (1934).
[3] L. Vargas, Ann. Inst. Biol. *5*, 83 (1934).
[4] J. Churý, Sborník VSZ, B *7*, 131 (1959); im Druck (1960).

Die Spermaextrakte wurden aus dem Azeton-Spermaniederschlag durch 24 h dauernde Extraktion mit physiologischer Lösung hergestellt. Die Extraktion wurde im Eisschrank bei + 4°C durchgeführt. Das Azetonpräzipitat des Spermaextraktes wurde durch Zugabe des 2,5fachen Volumens Azeton zum Spermaextrakt gewonnen. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und nach Auflösen in physiologischer Lösung benutzt. Die Spermaextrakte sowie die Lösung des Azeton-Präzipitats wurden den Ratten 2–3mal täglich während drei Tagen verabreicht. Am 4. Tag wurden die Tiere getötet. Bei Mäuseversuchen wurden die Injektionen nur während zwei Tagen verabreicht; am dritten Tage wurden die Mäuse getötet. Die biologische Wirkung der Spermaextrakte und des Azetonpräzipitats wurde an Ovarien und Mäuseuteri bestimmt. Das Uterusgewicht wurde mit der Torsionswaage gemessen, die Veränderungen an Ovarien histologisch bestimmt. Um den Stoff, welcher im Sperma biologisch wirksam ist, näher zu bestimmen, wurden Papierelektrophorese, Papierchromatographie sowie die Biuret- und Molisch-Reaktion benutzt.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass bei Mäusen die Applikation von Spermaextrakten und Azetonpräzipitatlösung starke Uterusgrössenveränderungen hervorruft. Bei den Kontrollmäusen betrug das durchschnittliche Uterusgewicht 3,8 ± 0,7 mg; nach Spermaextraktinjektionen stieg es auf 7,2 ± 0,9 mg und nach Azetonpräzipitatlösung auf 12,3 ± 1,2 mg. Diese Uterusgrössenveränderungen können durch die früheren Befunde und Angaben DELFS[5], FEVOLD[6], sowie CLARINGBOLD und LAMOND[7] erklärt werden. Bei den Ratten rufen die Spermaextraktinjektionen sowie die Applikation von Azetonpräzipitat-Lösung das Wachstum des Ovars hervor. Die Ovarienvergrösserung war nach den Injektionen von

[5] E. DELFS, Endocrinology *28*, 196 (1941).
[6] H. L. FEVOLD, Endocrinology *28*, 33 (1941).
[7] P. J. CLARINGBOLD und D. R. LAMOND, J. Endocrin. *16*, 86 (1957).

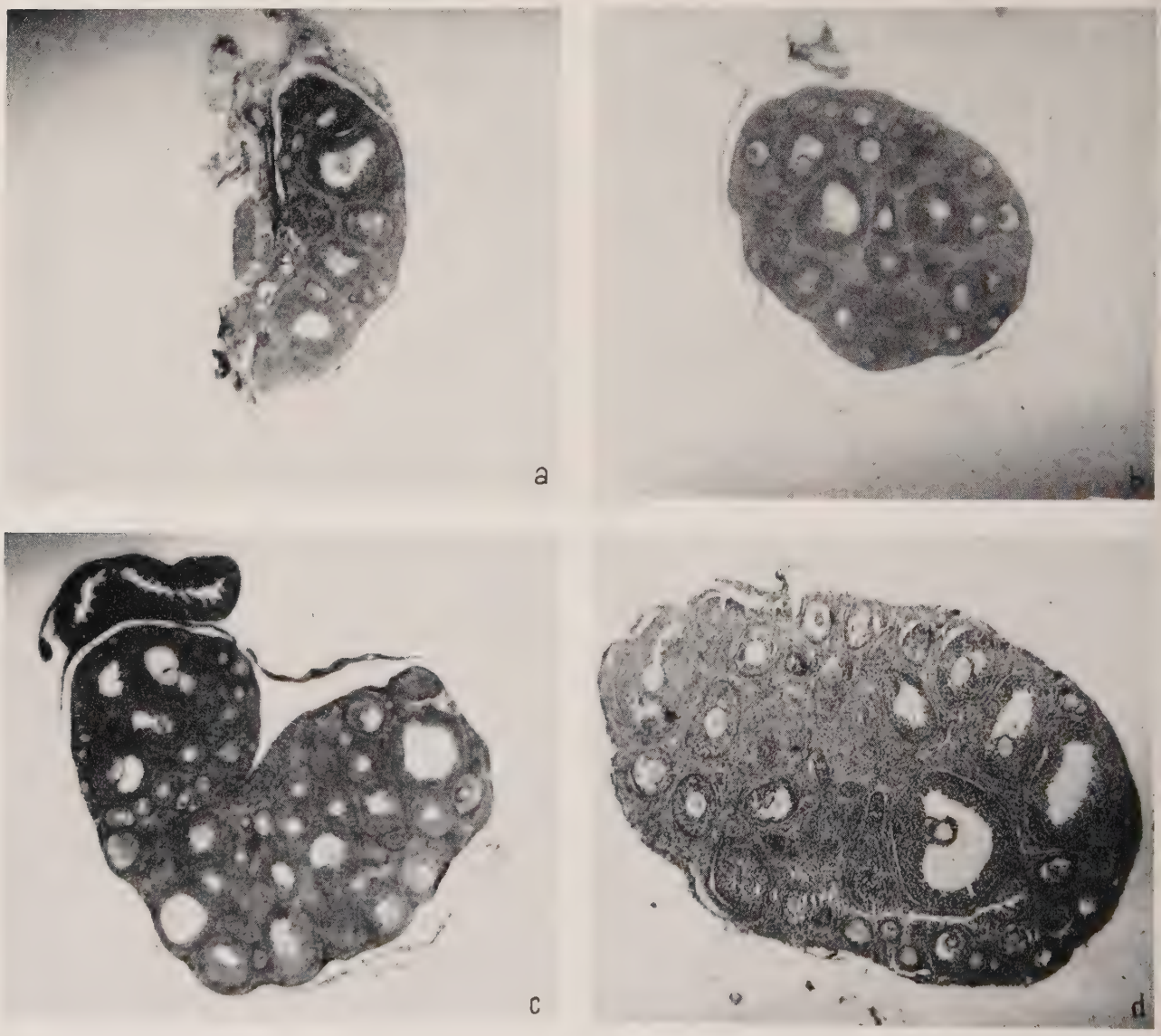


Fig. 1. (a) Ovarium von infantilen Ratten; (b) Ovarium von infantilen Ratten nach Injektionen von inaktiviertem Spermaextrakt; (c) Ovarium nach Injektion von 2,1 ml aktiven Spermaextraktes; (d) Ovarium nach Injektion von 3,6 ml Spermaextrakt. Die mikroskopischen Aufnahmen sind alle 120fach vergrössert. Färbung Hämatoxylin-Eosin.

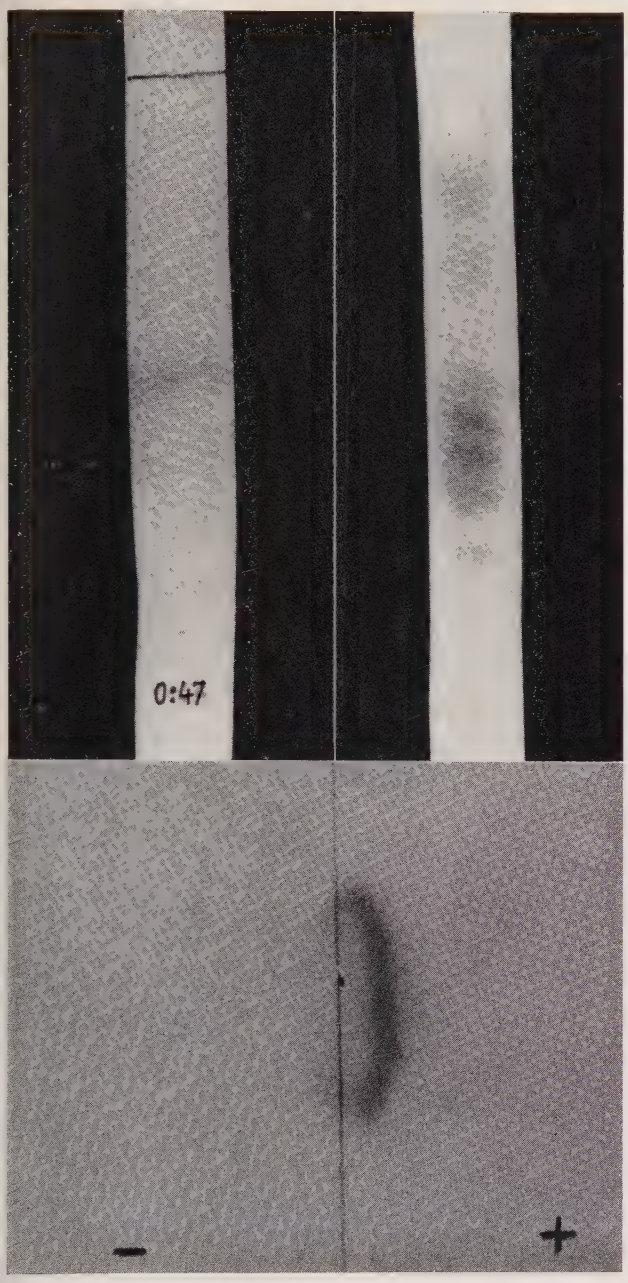


Fig. 2. Links oben: Papierchromatogramm von 0,01 ml Peptid-Lösung. Entwicklungssystem Butanol-Essigsäure-Wasser. Rechts oben: Papierchromatogramm des partiellen Hydrolysats des Peptids; Entwicklungssystem dasselbe. Unten: Elektropherogramm der Peptid-Lösung; 0,02 ml, 300 V, Essigsäurepuffer von pH 1,7.
Bemerkung: Alle Photos prom. Biologe Crha.

Azetonpräzipitatlösung ausgeprägter als nach der Verabreichung von Spermaextraktinjektionen. Übersichtlich sind die makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen der Ovarien in der Figur 1 dargestellt. Inaktivation des Spermaextraktes während 1 h durch 90–95°C beeinflusst die biologische Wirksamkeit nur geringfügig.

Obwohl zwischen der Gruppe, die mit FSH behandelt wurde, und der Gruppe, welche mit Spermaextrakt oder Azetonpräzipitatlösung behandelt wurde, histologisch einige Differenzen bemerkbar sind, finden wir in beiden Reihen Stimulation des Follikelwachstums, Beschleunigung des Ovarienwachstums und der Vermehrung der Granulosazellen, also jene Erscheinungen, die für die Wirkung von FSH typisch sind. Ausser diesen biologischen Wirkungen konnten wir auch eine ziemlich starke Nebennierenhypertrophie beobachten und in einigen Fällen eine Verkleinerung der Hypophyse. Ob diese Veränderungen spezifisch sind, müssen jetzt weitere Versuche abklären.

Obwohl der in Spermaextrakten anwesende Stoff biologisch dem FSH nahe steht, ist er mit diesem Hormon nicht identisch. Die papierelektrophoretischen und papierchromatographischen Studien zeigten, dass es sich um ein Peptid handelt. Das Peptid hat ungefähr 13 Aminosäurereste, enthält einen Zucker (positive Molisch-Reaktion); seine biologische Aktivität beträgt ungefähr 35 Einheiten/g. Chromatographisch und elektrophoretisch verhielt sich der Stoff einheitlich (Figur 2). Unseren Schätzungen nach enthalten 100 ml Ebersperma ungefähr 0,04–0,05% dieses Stoffes.

In den Vordergrund treten nun einige Fragen: (1) ob die beschriebene Wirkung direkt oder indirekt ist, (2) welchen Ursprungs dieser Stoff im Sperma ist. Eine Beantwortung dieser Fragen können nur weitere Versuche ergeben. Wir hoffen aber, dass der Befund eines biologisch wirksamen Peptids im Sperma einige Befunde anderer Forscher näher klären kann; in erster Linie die Angaben von Stratman und Self[8], Dokunin[9] und Pitkjanen[10], sowie auch die Angaben von Lamond und Claringbold[11].

Summary. The action of sperm extracts and acetone precipitate of these extracts upon the growth of ovary and uterus was investigated on infantile mice and rats. It was found that injections of the above-mentioned agents increased the uterine and ovarian weights and caused microscopic changes similar to those caused by FSH. The active principle present in the sperm must be a peptid.

J. Churý

Biologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät Brno (ČSSR), 23. Februar 1961.

[8] F. W. Stratman und H. L. Self, J. Animal Sci. *19*, 1081 (1960).
[9] A. V. Dokunin, Bjull. exp. Med. Biol. *8*, 106 (1957).
[10] I. G. Pitkjanen, Žurnal obšč. biol. *21*, 28 (1960).
[11] D. R. Lamond und P. J. Claringbold, J. Endocrin. *16*, 298 (1958).

Nitrosamines and Other Carcinogens as Agents of Protein Denaturation[1,2]

The hypothesis that a relationship exists between carcinogenesis and protein denaturation was set forth as early as 1938 by Rondoni (reviewed in [3]). During denaturation a protein molecule passes from a specific configuration to a less orderly structure, while similarly in carcinogenesis there is an increasing anaplasia in the tissue. Ambrose[4] has pointed out a more direct connection between dedifferentiation of tissue morphology at the microscopic level and submicroscopic alterations at the macromolecular level. Similar concepts have been reached

[1] This work was supported by USPHS Grant CY-4939 at the University of Florida, and by USPHS Grant C-5431 and a Grant-in-aid from the Greater New Orleans Cancer Association and the Cancer Sociefy of Greater Baton Rouge, at Tulane University.
[2] Presented at the Fifty-second Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Atlantic City, N. J., April, 1961 (Abstr., Proc. Amer. Assoc. Cancer Research *3*, 206 (1961)).
[3] P. Rondoni, Adv. Cancer Res. *3*, 171 (1955).
[4] E. J. Ambrose, Brit. J. Cancer *8*, 259 (1954).

by other authors[5–7]. The present report gives the first direct demonstration that carcinogens are agents of protein denaturation.

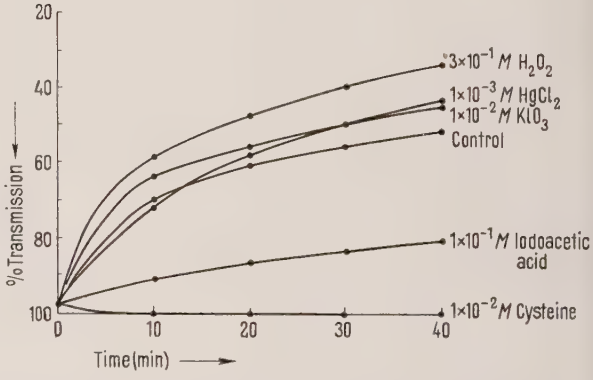
Using turbidity increase of protein solutions to measure denaturation, the results given in the Table indicate that the known water-soluble carcinogens tested here are potent protein denaturants. Diethylnitrosamine, ethyl carbamate and dimethylnitrosamine were also found to precipitate bovine serum albumin in the same relative order of activity as found with ovalbumin. Following the method given in the Table it was found that bovine and human serum albumin, and mercaptalbumin are more resistant than ovalbumin to this type of denaturation produced by dimethylnitrosamine.

This denaturation, measured by turbidimetry, differs from that obtained with urea which causes the disappearance of the native three-dimensional structure of proteins by unfolding the polypeptide chains. Protein denaturation by urea is not accompanied by turbidity increase, but coincides with an increase of optical rotation of the solution. For turbidity increase to take place molecular aggregation must occur involving intermolecular bonds. The Figure summarizes a series of experiments which strongly suggest that the formation of disulfide bridges, by -SH groups made available as a result of unfolding of the protein structure by agents listed in the Table, is a type of intermolecular bond involved here[12]. Mercuric chloride which is known to form –S–Hg–S– bridges, and the oxidizing agents, hydrogen peroxide and potassium iodate, which would favor the formation of disulfide bridges, were all found to enhance the precipitation of ovalbumin by dimethylnitrosamine. None of these agents alone, however, initiate the precipitation of ovalbumin. Iodoacetic acid inhibits the precipitation of ovalbumin by reacting with –SH groups and thus blocking the formation of disulfide bridges. Cysteine, which splits disulfide bonds by virtue of its reducing ability, completely inhibits the precipitation of ovalbumin by dimethylnitrosamine. Moreover, it was found that when 1×10^{-2} *M* cysteine is added at 40 min it completely reverses the precipitation of ovalbumin by dimethylnitrosamine, tannic acid or phenol. Similar observations were made with glutathione. This agent, although as active as cysteine to inhibit precipitation, is less active in reversing this phenomenon. This may be related to lesser permeability of the molecular aggregates to glutathione than to cysteine because of the greater molecular size of the former.

Although urea does not cause precipitation of ovalbumin (Table), it is capable of both enhancing and inhibiting the precipitation caused by 1.5 *M* dimethylnitrosamine. Concentrations below 3.3 *M* urea cause enhancement, while concentrations above 5 *M* cause inhibition. Since the extent of urea-induced unfolding of the polypeptide chains in proteins depends on concentration, the ambivalent effect of urea noted in the turbidity studies may be explained by the fact that disulfide bridges are probably not the only intermolecular bonds maintaining the molecular aggregates. It is possible that intermolecular hydrogen bonding between other groups around the molecular site of the –SH groups may be involved, reinforcing the disulfide linkages formed. The fact that urea exerts its effect on proteins by breaking hydrogen bonds suggests that the carcinogens tested (Table) interact by means of these same valence forces. Preliminary studies have shown that dimethylnitrosamine and dioxane are indeed capable of forming strong hydrogen bonds. Water solutions of these agents display a considerably greater viscosity (1×10^{-2} $\nu_{max} = 1.36$ for dimethylnitrosamine plus water and 1.78 for dioxane plus water) than dimethyl-

The relative ability of these compounds to cause protein denaturation was measured photometrically at 520 mμ by comparing the molar concentrations necessary to produce a 50% decrease in the % transmission at 40 min of a 1% ovalbumin solution at pH 5. Each value in the Table represents the average of four experiments. The carcinogenic activities ('+' active; '—' inactive) of most compounds were taken from HARTWELL's tables[8]. The carcinogenicity of dimethylnitrosamine shown by MAGEE and BARNES[9], and the relatively greater activity of diethylnitrosamine reported by SCHMÄHL and PREUSSMANN[10] have been confirmed in our laboratory[2]. Dimethylhydrazine proved to be inactive as a carcinogen[2]. HOHL has shown that at identical concentrations the carcinogen, ethyl carbamate, and dioxane produce similar chromosomal abnormalities in plant roots[11].

Compound	Molarity necessary to bring about 50% decrease in % transmission of 1% ovalbumin	Carcinogenicity
Tannic acid	0.001	+
Phenol	0.077	+
Diethylnitrosamine	0.440	+
Thioacetamide	0.730	+
Ethylcarbamate	0.830	+
Diethylacetamide	0.850	Untested
Diethylformamide	0.920	Untested
Thiourea	0.930	+
Dimethylnitrosamine	1.550	+
Dioxane	1.800	?; produces chromosomal abnormalities
Dimethylacetamide	2.330	Untested
Acetone	2.430	– to the skin
Dimethylformamide	2.800	Untested
Ethanol	3.330	+ ?
Acetamide	4.800	Untested
Urea	No precipitation up to 5 *M*	–
Dimethylhydrazine	No precipitation up to 6 *M*	–
Dimethylamine	No precipitation up to 0.25 *M*	Untested
Diethylamine	No precipitation up to 6 *M*	Untested



Effect of sulfhydryl reagents on the precipitation by 1.5 *M* dimethylnitrosamine of a 1% ovalbumin solution, as measured by turbidimetry at 520 mμ.

[5] N. P. BUU-HOÏ, Acta Union Int. contre Cancer *7*, 68 (1950).
[6] J. C. ARCOS and M. ARCOS, Bull. Soc. Chim. Belges *65*, 5 (1956).
[7] R. MASON, Brit. J. Cancer *12*, 469 (1958).
[8] J. L. HARTWELL, *Survey of Compounds which Have Been Tested for Carcinogenic Activity* (U.S. Government Printing Office, Washington (D.C.) 1951).
[9] P. N. MAGEE and J. M. BARNES, Brit. J. Cancer *10*, 114 (1956).
[10] D. SCHMÄHL and R. PREUSSMANN, Naturwiss. *47*, 89 (1960).
[11] K. HOHL, Exper. *3*, 109 (1947).
[12] Dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine themselves do not form covalent bonds involving sulfhydryl groups of proteins as shown by iodosobenzoic acid titration of cysteine, glutathione, ovalbumin and soluble rat liver proteins before and after incubation with these carcinogens.

nitrosamine, dioxane or water alone (1×10^{-2} $\nu = 0.82$, 1.13, and 0.86 respectively). On the other hand, no such increase is observed in mixtures of dimethylnitrosamine and benzene, or dimethylnitrosamine and dioxane because of the absence of a hydrogen donor.

Dimethylhydrazine (1×10^{-2} $\nu = 0.69$), which is a reduced derivative of dimethylnitrosamine, also forms hydrogen bonds as indicated by a considerable increase of viscosity of water solutions (1×10^{-2} $\nu_{max} = 5.90$), but does not bring about precipitation of ovalbumin (Table). This compound, however, is a strong reducing agent, and thus it was not unexpected when it was found that 0.1 *M* dimethylhydrazine both inhibits and reverses the precipitation of ovalbumin by 1.5 *M* dimethylnitrosamine.

A full account of these and related investigations will be given elsewhere.

Résumé. Les auteurs montrent que les composés cancérogènes hydrosolubles, l'acide tannique, le phénol, la diéthyl- et diméthylnitrosamine, la thioacétamide, le carbamate d'éthyl et la thiourée sont des agents puissants de dénaturation de protéines. La précipitation produite par ces agents peut être inhibée, inversée ou accrue par divers réactifs de groupes sulfhydryles. Ces recoupements, ainsi que d'autres expériences sur l'effet de l'urée sur la précipitation par la diméthylnitrosamine, indiquent que le mécanisme de la formation des aggrégats moléculaires consiste dans l'établissement de ponts –S–S– intermoléculaires, probablement renforcés par des liaisons intermoléculaires d'hydrogène.

Mary F. Argus, Charlotte J. Leutze, and Judith F. Kane

Research Laboratory, U.S. Public Health Service Hospital, Departments of Medicine and Biochemistry, Tulane University, New Orleans (Louisiana), and Cancer Research Laboratory, University of Florida, Gainesville (Florida), April 11, 1961.

Pathogenesis of the Uremic Syndrome[1]. Pharmacological Studies on Acetoin and 2,3-Butylene Glycol[2]

Most of the uremic manifestations are as yet unexplained. Numerous attempts to relate the symptoms of the uremic syndrome to accumulation of a single toxic substance have failed to receive clinical or experimental substantiation. The mechanisms of Kussmaul's respiration, of hyperkaliemic cardiac arrest and of hypokaliemic intestinal and muscular paresis show that the pathogenesis of the uremic syndrome is very complicated. The uremic disturbances of consciousness are of particular interest. They cannot be differentiated from the hepatic coma. In most cases with uremic disturbances of consciousness, residual-nitrogen in serum is increased. Electrolyte imbalance, water intoxication, ammonia, urea and phenol compounds are not correlated to the disturbances of consciousness in uremia[3–5].

In the blood of patients with uremia or hepatic coma, pyruvic acid is raised[6,7]. In mammals pyruvic acid is decarboxylated to active acetaldehyde[8,9]. Active acetaldehyde is mainly converted to acetyl-coenzyme A or may react with acetaldehyde to give acetoin[8,9]. Acetoin may be reduced to 2,3-butylene glycol. The increase in blood pyruvic acid concentration above the normal range in patients with uremia and hepatic coma is probably due to reduced formation of acetyl-coenzyme A. It might be expected that, as a compensatory mechanism, formation of acetoin and 2,3-butylene glycol is enhanced (Figure 1). Glycols produce narcosis, inflammation, hemolysis and impaired permeability. This paper presents observations on the pharmacology of acetoin and 2,3-butylene glycol.

Methods. Narcotic effects on mice after intraperitoneal injection of acetoin or 2,3-butylene glycol. Potentiation of narcosis by acetoin or 2,3-butylene glycol on mice. Blood pressure: canulation of arteria carotis of white rats; kymographic registration; intravenous injection of acetoin or 2,3-butylene glycol. Rate of respiration of anesthetized white rats; intravenous injection of acetoin or 2,3-butylene glycol. Effects of 2,3-butylene glycol on capillary vessels of the frog's web.

Results. In mice acetoin and 2,3-butylene glycol produce a narcotic effect. Before narcosis, muscular twitching may be observed. Acetoin is about four times more active in producing narcosis than 2,3-butylene glycol. After rapid intravenous injection of acetoin or 2,3-butylene glycol in rats, blood pressure (Figure 2), pulse rate (Figure 3) and rate of respiration decrease (Bezold-Jarisch reflex). 2,3-butylene glycol dilatates the capillary vessels of the frog's web.

Discussion. In patients with uremia or hepatic coma, blood pyruvic acid is elevated. In men pyruvic acid is converted to acetyl-coenzyme A, or to acetoin and 2,3-butylene glycol. In patients with renal and hepatic disease, the conversion of pyruvic acid to acetyl-coenzyme A might be markedly reduced and the formation of acetoin from pyruvic acid increased. Increased acetoin and 2,3-butylene glycol in blood could be demonstrated in patients with renal or hepatic disease[10,11].

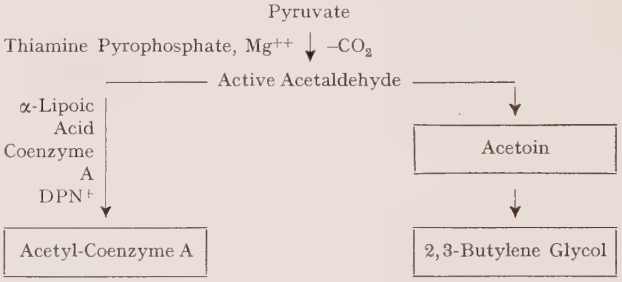


Fig. 1. Metabolism of pyruvic acid in men and mammals.

[1] The study was aided by grants from 'Schweizerischer Nationalfonds' and from F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel.

[2] 3rd Communication. 2nd Commun. see: F. Bigler, H. Thölen, and H. Staub, Helv. physiol. pharmacol. Acta *19*, C 11 (1961).

[3] H. Thölen and R. Bosshardt, Klin. Wschr. *36*, 481 (1958).

[4] H. Thölen and R. Bosshardt, Klin. Wschr. *36*, 574 (1958).

[5] H. Thölen and R. Bosshardt, Schweiz. Med. Wschr. *89*, 955 (1959).

[6] D. S. Amatuzio and S. Nesbitt, J. clin. Invest. *29*, 1486 (1950).

[7] G. Biserte and B. Dassonville, Clin. chim. Acta *1*, 49 (1956).

[8] J. Järnefelt, Ann. Acad. Sci. fennicae ser. A, V, *57*, 1 (1955).

[9] H. Holzer and K. Beaucamp, Biochim. biophys. Acta *46*, 225 (1961).

[10] H. Thölen, F. Bigler, and H. Staub, in publication.

[11] For the determination of acetoin and 2,3-butylene glycol in blood, we used a modification of the method of Westerfeld and of the method of Happold and Spencer.

In this paper it is pointed out that acetoin and 2,3-butylene glycol produce narcotic effects on mice and that acetoin is more active than 2,3-butylene glycol. These data suggest that the two substances might be responsible for the disturbances of consciousness in patients with uremia or hepatic coma. In cerebral tissues of mammals, acetoin and 2,3-butylene glycol are produced from pyruvic acid[3]. Probably an impaired metabolism in renal and hepatic failure may enhance the cerebral synthesis of acetoin. It is our impression that the amounts of acetoin and 2,3-butylene glycol formed in brain correlate with the appearance of narcosis in uremic syndrome. Blood analyses of these substances hardly allow conclusions as to their narcotic effects. The accumulation of acetoin and 2,3-butylene glycol in liquor cerebrospinalis might parallel changes of these metabolites in brain. In two patients with uremic coma, acetoin and 2,3-butylene glycol were markedly increased in liquor cerebrospinalis. One patient showed increasing liquor values during deterioration of consciousness. We believe that the etiological problem cannot be solved by analysis of acetoin and 2,3-butylene glycol in liquor cerebrospinalis. Analysis of acetoin and 2,3-butylene glycol in various parts of brain of patients with uremic and hepatic coma will be necessary for further investigations.

Zusammenfassung. Acetoin und 2,3-Butylenglykol entstehen bei Menschen und Tieren aus Brenztraubensäure. Beide Substanzen bewirken bei Mäusen Narkose. Bei Ratten tritt der Bezold-Jarisch-Reflex auf. Die Rolle von Acetoin und 2,3-Butylenglykol bei urämischen und hepatischen Bewusstseinsstörungen wird diskutiert.

H. THÖLEN, F. BIGLER, and H. STAUB

Medizinische Klinik der Universität Basel, April 11, 1961.

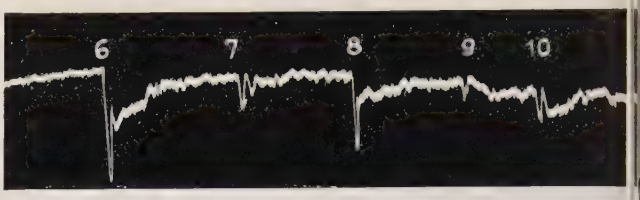


Fig. 2. Registration of blood pressure in white rat (420 g) after 6: 150 mg acetoin; 7: 150 mg 2,3-butylene glycol; 8: 100 mg acetoin; 9: 75 mg acetoin; 10: 150 mg 2,3-butylene glycol.

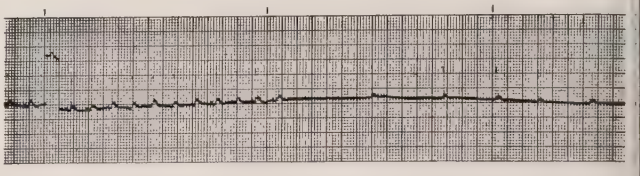


Fig. 3. Electrocardiogramm; white rat (420 g); i.v. injection of 200 mg 2,3-butylene glycol in the moment of voltage calibration.

An Ageing Effect in Inhibited Esterases: Elimination of Phenol from DPClP-Inhibited Chymotrypsin and Trypsin

Ageing effects in inhibited esterases are of interest in relation to the problem of reactivation.

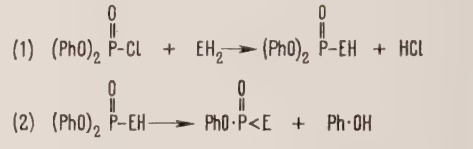
We have studied the behaviour of chymotrypsin and trypsin after inhibition with DPClP[1,2]. Using a sensitive colorimetric method[3], we have shown that solutions of these enzymes inhibited in this way liberate phenol stoichiometrically at pH 8. These results indicate that inhibited esterases, in some circumstances, can undergo ageing by a secondary reaction at the site of normal esteratic activity.

Chymotrypsin in sodium phosphate buffer at pH 8, was treated with DPClP. Inhibition of the enzyme rapidly occurred. Estimation of phenol in samples of the solution, using diazotised *p*-nitroaniline, showed that phenol was gradually liberated. The rate of phenol production (Figure 1) was found to approach a limiting value of 1 M/M of inhibited enzyme over a period of 60 min. Experiments in which the ratio of inhibitor to enzyme was increased (Figure 2) showed that the amount of phenol liberated per M of enzyme was independent of the concentration of (excess) inhibitor. Similar results were obtained with trypsin. Solutions of chymotrypsinogen and trypsinogen, on the other hand, liberated no phenol in the presence of inhibitor.

These results imply that two reactions are involved.

Reaction (1) corresponds to normal (rapid) inhibition of the enzyme (EH_2), by DPClP. Reaction (2) represents a secondary step in which phenol is eliminated from the inhibited enzyme.

We have suggested earlier[2,4] that phenol release from DPClP-inhibited chymotrypsin is due to nucleophilic activation of a phenyl phosphate group attached to the



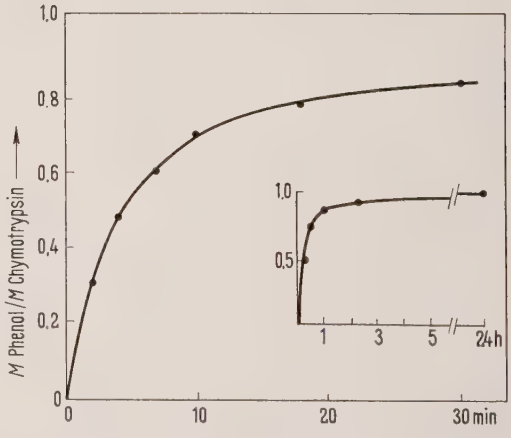
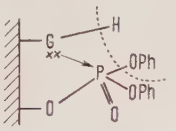


Fig. 1. Rate of liberation of phenol from a 50 ml reaction mixture containing α-chymotrypsin (0.033 g of a salt-free preparation from Armour Ltd.) and DPClP (0.1 ml of freshly prepared 2% solution in dry dioxan) in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 8.0 at 20°C.

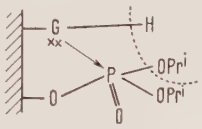
[1] DPClP = Diphenylphosphorochloridate.
[2] W. LEE and J. H. TURNBULL, Biochim. biophys. Acta *30*, 655 (1958).
[3] W. LEE and J. H. TURNBULL, Talanta *3*, 318 (1960).
[4] G. J. DURANT, J. H. TURNBULL, and W. WILSON, Chem. and Ind. *1958*, 157.

active site of the enzyme. This view is now strengthened by our finding that phenol liberation from the inhibited enzyme occurs in the region of pH 6 to 8, where the enzyme itself normally functions. Bearing in mind the structural similarities between chymotrypsin and trypsin, inhibition of both enzymes by DPClP may be depicted by structure I, in which the diphenylphosphoryl group is firmly bound to the serine at the active site, GH being the nucleophilic group (pK 6–7) associated with normal esterase activity. Although the enzyme is inhibited by blocking of the serine (I), at pH 8 the group GH is still free to interact with the phosphoryl group causing intramolecular elimination of 1 *M* of phenol.

The foregoing process is significant in connection with the ageing of DFP-inhibited pseudocholinesterase[5], which would now appear to be due to the elimination of one mole of isopropanol at the inhibited esteratic site of the enzyme by a similar mechanism (II). This emphasises the resemblance between the esteratic sites of chymotrypsin, trypsin and pseudocholinesterase.



(I)



(II)

A detailed kinetic treatment of our reactions will be published subsequently.

Résumé. Les solutions de chymotrypsine et de trypsine inhibitées par le diphényle phosphorochloridate éliminent le phénol par un processus stoichiométrique, selon une réaction secondaire qui se produit spontanément dans la région du pH 6–8. Les auteurs émettent une proposition quant aux modalités de ce processus qu'ils appliquent au vieillissement du D.F.P.-pseudocholinestérase.

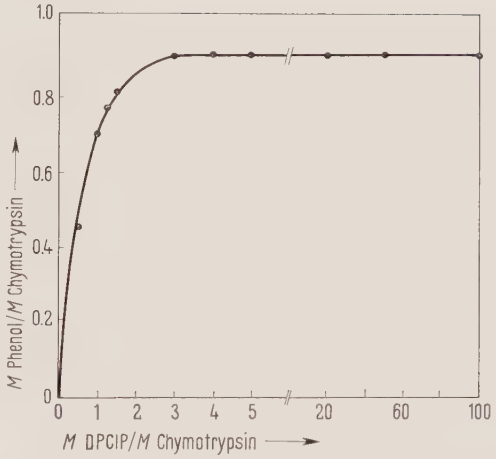


Fig. 2. Effect of DPClP/chymotrypsin ratio on amount of phenol liberated by chymotrypsin-DPClP reaction mixtures in 0.1 *M* sodium phosphate, pH 8.0 after incubation for 1 h at 20° C.

W. Lee[6] and J. H. Turnbull[7]

Chemistry Department, University of Birmingham (England), April 17, 1961.

[5] F. Berends, C. H. Posthumus, I. v. d. Sluys, and F. A. Deierkauf, Biochim. biophys. Acta *34*, 576 (1959).

[6] Present Address: Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin, Madison (U.S.A.).

[7] Present Address: Applied Chemistry Branch, Royal Military College of Science, Shrivenham (Wiltshire, England).

X-Ray Microscopy of Intestinal *Villi*

The vascular pattern of intestinal *villi* can be demonstrated by projection X-ray microscopy. The minute blood vessels of the intestinal *villus* have hitherto been studied in various laboratory animals and man either histologically[1] or by injection and clearing techniques[2]. More recently the *villus* circulation has been observed by quartz rod transillumination[3]. Although the blood supply of the gastro-intestinal tract has been studied radiologically by various workers[4,5] no study of the microcirculation of the intestinal *villus* either by contact or projection X-ray microscopy has been reported.

Renewed interest in the absorptive role and functions of the intestinal *villi* has arisen out of investigations into the relationship between intestinal mucosal changes and certain malabsorptive disorders in the human. The introduction of peroral intestinal biopsy has already resulted in the description of abnormal *villi* and a disorganised capillary pattern[6,7].

Basic knowledge of the structure and function of the intestinal *villus* and its vessels however is limited, and derives mostly from the examination of histologically fixed and sectioned material, for study of the microcirculation within the wall of the living intestine suffers technical difficulties related to inadequate optical conditions[3]. Specifically both the opacity of the gut wall and short depth of *focus* of the optical microscope have limited vascular research on the intestinal *mucosa* and its *villi*.

X-ray microscopy owing to its penetration and great depth of field allows a complete three-dimensional view of the internal vascular detail of the specimen to be seen at one time, at either low or high magnification, so that the distribution, connections, and terminal features of a large or small vascular territory can be readily integrated. Visualisation of the volume pattern of the blood vessels can be recorded stereographically if so required, by simple lateral translation of the specimen between two X-ray exposures. X-ray microscopy moreover offers the advantage that vascular research may be conducted on both fresh and living tissue.

The X-ray micrographs of intestinal *villi* presented here were taken with the Cosslett-Nixon X-ray projection microscope[8]. In this instrument two magnetic lenses form a demagnified image of a thermionic electron source upon

[1] P. E. Smith and W. M. Copenhaver, *Bailey's Textbook of Histology* (Williams & Wilkins, 1953), p. 427.

[2] L. F. Jacobson and R. J. Noer, Anat. Rec. *114*, 85 (1952).

[3] S. Baez, Proc. 5th Conf. on the Microcirculation (University Illinois Press, 1959).

[4] H. B. Benjamin and A. B. Becker, J. Surg. Gynec. Obstetr. *108*, 134 (1959).

[5] J. D. Griffiths, Brit. Med. J. *1*, 323 (1961).

[6] R. H. Girdwood, I. W. Delamore, and A. Wyn Williams, Brit. Med. J. *1*, 319 (1961).

[7] C. Z. Rubin et al., Gastroenterology *38*, 28 (1960).

[8] V. E. Cosslett and W. C. Nixon, Proc. Roy. Soc. *B 14*, 422 (1952).

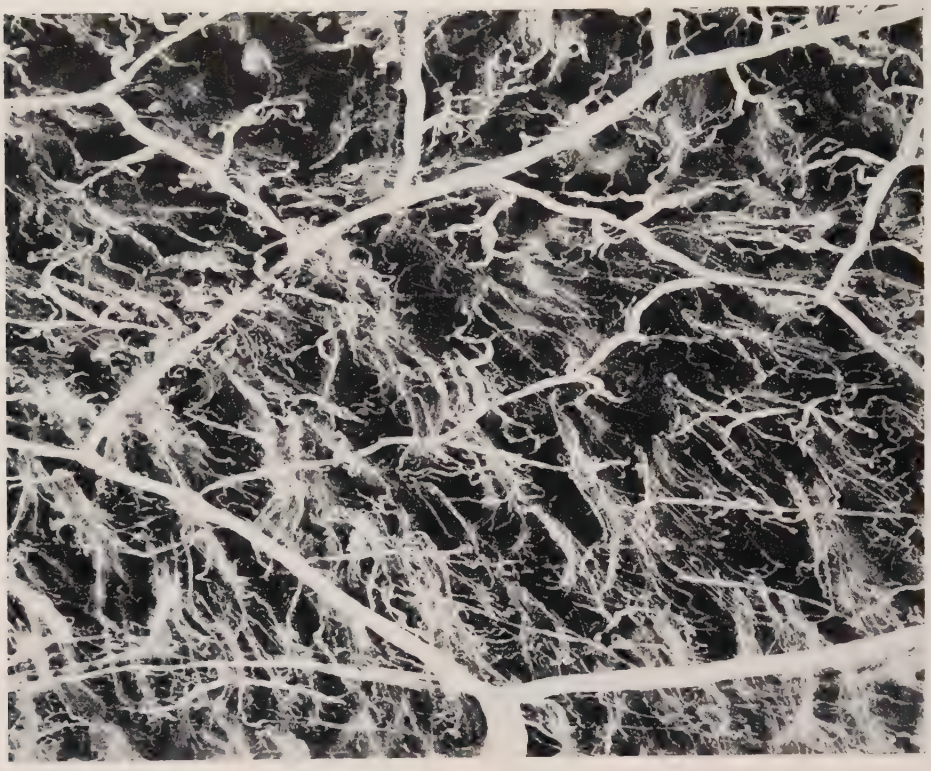


Fig. 1. Microangiogram of *ileum* showing the macromesh and micromesh vascular patterns and intestinal *villi* demonstrated by contrast medium (Micropaque). (Mag. ×55)

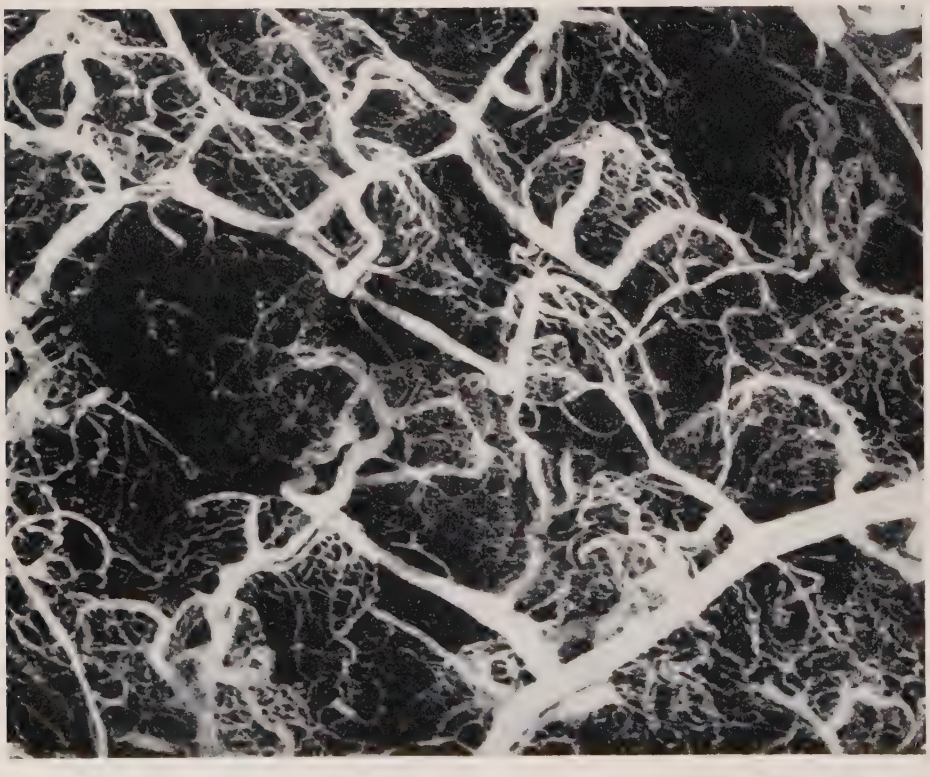


Fig. 2. Microangiogram of *duodenum* showing the origin of the arterioles and venules within the *villi*, and surrounding capillary network. Note the convergence of the axial veins of the *villi* upon the mucosal veins. (Mag. ×100)

a thin metal foil which serves both as X-ray target and window of the evacuated tube. A point source of X-rays about 0.5 to 1 μ in diameter is thus produced, and used to project an image of the specimen, which is placed close to the source in air, on to a distant fluorescent screen or photographic plate. The resolving power of the instrument is approximately equal to the X-ray source diameter, while X-ray magnification is determined by the ratio of the target-specimen and target-plate distances, both of which are variable.

The microangiograms presented (Figures 1 to 5) were obtained by successive irrigation of the small intramural vessels of the rabbit intestine with body warm solutions of a plasma extender with anticoagulant action (Dextran sulfate) and a contrast medium of colloidal dimension (25% Micropaque). This was achieved by infrarenal retro-

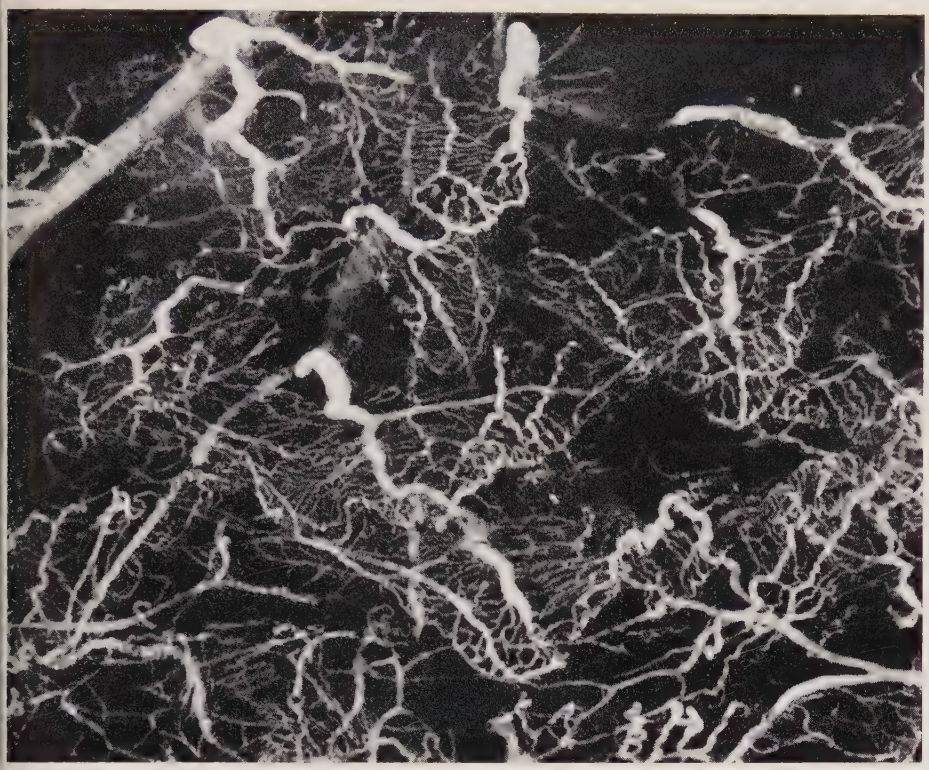


Fig. 3. Microangiogram of *jejunum* showing that the capillary network of the *villus* is derived from both the *villus* arteriole and subjacent submucous *plexus*. The large axial venules draining the *villi* are a striking feature. (Mag. ×96)

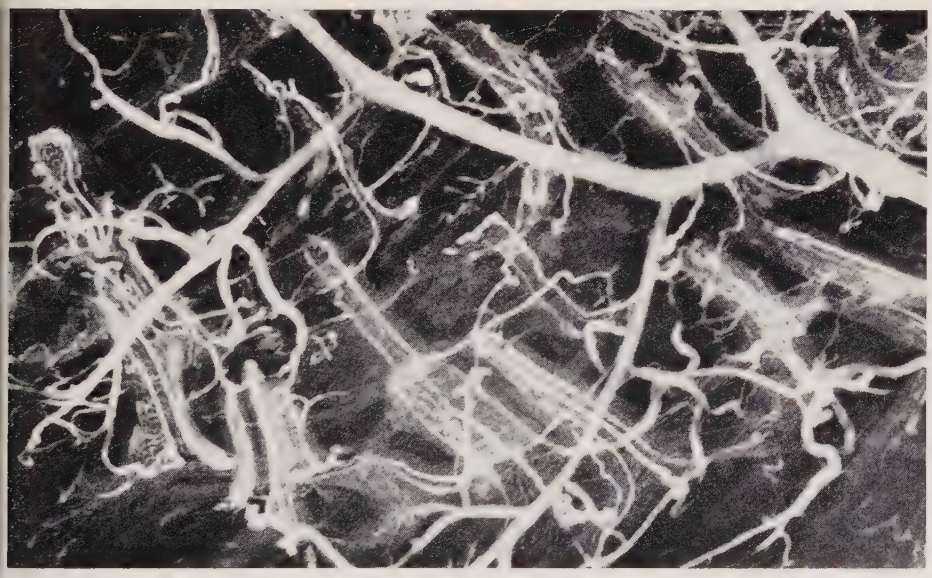


Fig. 4. X-ray micrograph of *jejunum* showing that some *villi* are supplied by two arterioles (see lower right). The *villus* arterioles are more slender than the corresponding venules. (Mag. ×95)

grade intubation of the abdominal *aorta* with fine polyethylene tubing (2.15 mm o.d.), and recovery by similar tubing introduced into the inferior *vena cava* immediately below the heart. Operative procedures were carried out on heparinised and anaesthetised animals, and irrigation effected with a pressure head of 1 m. Contrast medium was introduced soon after blanching of the small intestine was observed. Segments of *duodenum*, *jejunum*, and *ileum* were then removed and comparative studies made of formalin fixed, air dried, and fresh material, over the X-ray projection microscope. Microangiographic studies of exteriorised living small bowel are currently in progress in this laboratory.

The bowel loop or exsected portion thereof was positioned across the target assembly of the X-ray microscope, which lies within the polepiece of the upper or objective lens of the instrument. A thin aluminium foil target (4 μ thick) used with an accelerating voltage of 10 kV provided good resolution and adequate penetration for vascular studies of the opened bowel, while a thicker copper foil target (5–10 μ) and higher accelerating voltage of 15 to 25 kV provided better penetration for studies of the intact bowel.

The X-ray micrographs were recorded with a simple metal box camera, using varying target plate distances ranging from 0.5 to 2.5 cm. Detailed projection micrographs or microangiograms of the smallest blood vessels within the bowel wall were readily obtained using either standard lantern slide plates (Kodak Contrasty) or high resolution plates (Ilford), while working under atmos-

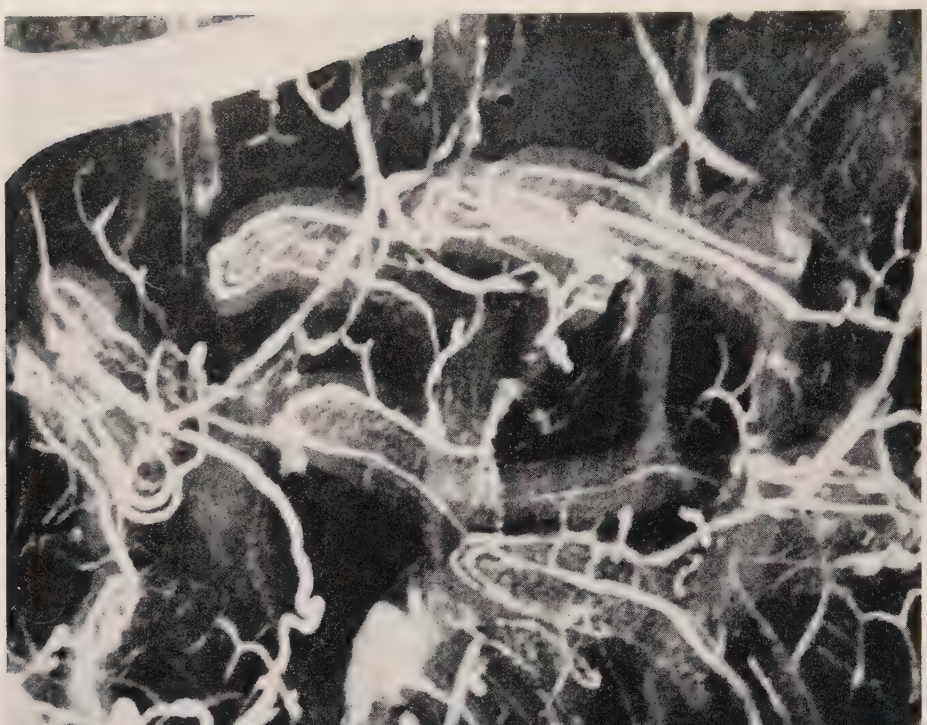


Fig. 5. X-ray micrograph of a cluster of jejunal *villi* showing arterio-venous anastomoses at the tips of several *villi*. The capillary network of the *villi* is not well filled with contrast medium. The *villus* arterioles are more slender than the corresponding venules. A *villus* tip is seen end-on at the left. (Mag × 193)

pheric conditions. Since the magnification is dependent upon the target-specimen and target-plate ratio, both the size of the vascular field and degree of magnification could be varied at will. Contact and projection studies of frozen sections (150 μ) were also recorded for purposes of comparison.

X-ray projection micrographs of the small intestine wall show the branches of the *vasa recta* or mural trunks entering the *submucosa* to ramify and anastomose with similar branches from neighbouring arteries to form the submucosal arterial network or *plexus*. Small mucosal arteries are seen to arise from both the main and subsidiary anastomosing branches of the submucosal *plexus*. As many as 10 to 14 mucosal arteries have been observed passing from a long secondary anastomotic arcade to supply adjacent *villi*.

These mucosal arteries follow a long or short course before breaking up into a leash of two, three or more fine arteries or arterioles to supply as many or fewer *villi*, so that a single or double branched vessel may be seen entering the base of a *villus*. These *villus* arteries or arterioles eventually terminate in the capillary bed of the *villus* and an apical arterio-venous anastomosis.

At higher magnification both the capillary network and apical arterio-venous anastomosis of the *villus* can be distinctly seen, as well as the manner in which the venous capillaries join the relatively large axial venule that drains the *villus*. The convergence of three or more such venules from neighbouring *villi* upon the subjacent mucosal vein is also readily followed.

The general vascular pattern and relation of the submucous *plexus* and its branches to the intestinal *villi* can be visualised in a single print such as Figure 1, which is a low power microangiogram of the whole thickness of the ileal wall. The basic vascular characteristic of the gut as earlier stated[9] and since confirmed[3,5] is the mesh pattern. Inside the large macromesh of the submucous *plexus* there exists a further network of smaller vessels or micromesh from which the arterioles supplying the capillaries arise, as may be seen in this and succeeding Figures.

Medium power microangiograms, such as Figure 2 depicting part of the duodenal wall, reveal the mode of termination of the mucosal arteries, origin of the arterioles and venules within the *villi*, as well as the surrounding capillary network. The capillary network of the *villus* is clearly derived from both the *villus* arteriole and the subjacent submucous *plexus*. The axial venules draining the *villi* are a striking feature, as is their convergence upon the mucosal veins (Figures 2 and 3). In some instances the venule of the *villus* appears to be marginal, and a number of *villi* are supplied by two arterioles (Figure 4).

Micrographs at higher magnification, such as Figure 5, which shows a cluster of jejunal *villi*, confirm the existence of an arterio-venous anastomosis at the tip of the *villus*. This would appear to take the form of a short circuit to bypass the fine capillary network of the *villus* when digestive processes are less active.

Comparison of the plates shows the variation in form of the *villi*, which may be low and broad, fingerlike, or triangular, as between the upper and lower ends of the small intestine. Density counts of *villi* could be readily determined from X-ray projection micrographs.

Zusammenfassung. Röntgenmikroskopische Studien an Darmzotten des Kaninchens zeigen das Gefässmuster der Zotten nach Injektion mit einem Kontrastmedium.

R. L. DE C. H. SAUNDERS, R. JAMES, and D. C. D'ARCY

Department of Anatomy, Dalhousie University, Halifax (Nova Scotia, Canada), May 2, 1961.

[9] R. L. DE C. H. SAUNDERS, J. LAWRENCE, D. A. MACIVER, and N. NEMETHY, *Peripheral Circulation in Health and Disease* (Ed. by W. REDISCH and F. F. TANGCO, Grune and Stratton, New York 1957), p. 113.

Absence of Salivary Invertase in Queen and Drone Honeybees

Worker honeybees' hypopharyngeal glands contain much invertase, and there is little or none in the other glands (post-cerebral, thoracic and mandibular) that discharge on their mouthparts[1,2]. Queen and drone honeybees have no hypopharyngeal glands, so the possibility that their other salivary glands might produce invertase has now been investigated. As drones' postcerebral and mandibular glands are vestigial, only their thoracic glands were tested.

Each pair of glands was removed under distilled water and ground up in sucrose solution buffered to pH 6.5. The amounts of glucose present before and after 24 h incubation at 35°C were estimated by the iodine oxidation method. The procedure was calibrated with a standard glucose solution and its reliability tested by titrations of buffered sucrose before and after incubation.

The amounts, if any, of invertase in the glands of queens and drones were small compared with those in the hypopharyngeal glands of workers (Table). The large standard error of the latter results from the great variation in the amount of invertase in individual bees.

When bees convert nectar into honey, its sucrose is inverted in their honey-stomachs, which can receive invertase only from the salivary glands. As queens and drones do not participate in honey storage they probably do not need salivary invertase. Drones, at least, eat large quantities of honey or nectar directly from the cells[3] but the invertase required to digest any sucrose this food contains is supplied by the mid-gut cells[4].

Invertase in salivary glands

Bees	Glands	Number of observations	Mean amount (mg) of glucose produced in 24 h	Standard error of mean
Worker	Hypopharyngeal	5	35.30	5.99
Queen	Mandibular	5	−0.72	0.36
Queen	Post-cerebral	6	0.25	0.86
Queen	Thoracic	6	−0.32	0.21
Drone	Thoracic	5	−0.36	0.43

Zusammenfassung. Untersuchungen an Mandibel-, Hinterkopf- und Thoraxdrüsen der Bienenkönigin sowie an Thoraxdrüsen der Drohne haben gezeigt, dass sie, verglichen mit den Hypopharynxdrüsen der Arbeiterin, nur sehr wenig oder gar keine Invertase enthalten. Da weder Königin noch Drohne an der Honigspeicherung teilnehmen, brauchen sie keine Speicheldrüsen-Invertase.

I. B. Riedel and J. Simpson

Bee Department, Rothamsted Experimental Station, Harpenden (Herts, England), May 2, 1961.

1 E. Kratky, Z. wiss. Zool. *139*, 120 (1931).
2 J. Simpson, J. ins. Physiol. *4*, 107 (1960).
3 J. B. Free, Brit. J. anim. Behav. *5*, 7 (1957).
4 E. N. Pavlovsky and E. J. Zarin, Quart. J. micr. Sci. *66*, 509 (1922).

Similar Pattern of Fine Structure in the Basement Lamella of the Skin and the External Sheath of the Notochord in *Xenopus* larvae[1]

Electron microscopical observations on the larval skin of various Amphibian species revealed a common pattern of fine structure in the basement lamella of the epidermis[2–7]. As already suggested by Rosin[4] from studies by light microscopy, the basement lamella was found to consist of orthogonally arranged plies of collagenous fibrils which gradually appear during embryonic development[2].

In the course of electron microscopical observations on tissues of *Xenopus* larvae, we found a very striking similarity in the texture of the basement lamella of the epidermis and in the external sheath of the notochord. The present findings refer to tail tissue of *Xenopus* larvae, measuring about 30 mm in length. The tissue samples were fixed in a mixture of 1% OsO_4 and 0.5% neutralized potassium-di-chromate for 3 h and then immediately transferred into 65% alcohol containing 0.1% uranium nitrate. For dehydration, embedding and sectioning, the conventional procedures were followed.

Figure 1 represents the basement lamella which is located between the epidermal and the pigment cells. The boundary of the epidermal cells is marked by the so-called 'hyaline layer' which is about 0.2 μ thick and contains fibrillar and presumably also granular components. The basement membrane proper is composed of about 12 orthogonally arranged plies, some of which reveal at least two layers of collagenous fibrils. In *Xenopus* larvae the collagenous fibrils are on an average 200 Å thick, and show a periodicity of about 400 Å; it is also noteworthy that open communications may be found between the intralamellar space and the underlying pigment cells. The total thickness of the basement membrane, including the hyaline layer, is about 1.5 μ.

Figure 2 represents a small portion of the external sheath of the notochord in cross-section. It clearly reveals the pattern of orthogonally arranged plies in which the collagenous fibrils are rather tightly packed. On closer inspection, there are some differences as compared with the basement lamella. Thus, the outer boundary (500 Å) of the sheath is composed of very thin circular fibrils. Its body shows at least 13 crossed plies which often comprise several layers of fibrils, having similar dimensions as those of the basement lamella. At the inner boundary, the sheath communicates with the epithelial cells of the notochord.

In summary, our observations on *Xenopus* larvae reveal the occurrence of a common texture in both the epidermal basement lamella and the external sheath of the notochord, being composed of orthogonally arranged collagenous fibrils of approximately 200 Å in diameter. In the notochord sheath, the collagenous fibrils are more tightly packed than in the basement lamella[8].

1 Supported by the 'Swiss National Science Foundation for the Promotion of Scientific Research'.
2 N. E. Kemp, Developmental Biol. *1*, 459 (1959).
3 K. R. Porter, Anat. Rec. *118*, 433 (1954).
4 S. Rosin, Rev. Suisse Zool. *53*, 133 (1946).
5 M. M. Salpeter and M. Singer, J. biophys. biochem. Cytol. *6*, 35 (1959).
6 P. Weiss and W. Ferris, Exp. Cell Res. *6*, 546 (1954).
7 P. Weiss and W. Ferris, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. *40*, 528 (1954).
8 The author is greatly indebted to the Laboratory of Electron Microscopy at the Institute of Inorganic Chemistry in the University of Bern for all facilities that were put at his disposal.

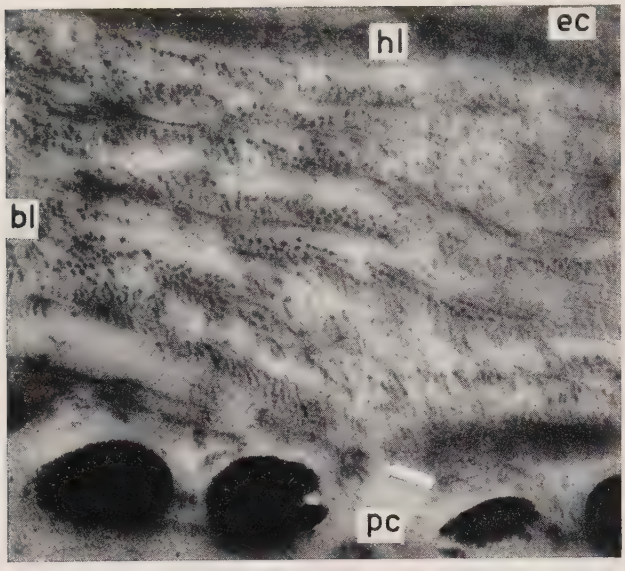


Fig. 1. *Basement lamella* (32 000 : 1): ec = epidermal cells, hl = hyaline layer, bl = basement lamella with crosswise arranged collagenous fibrils at (↓) communicating with pigment cell (pc).

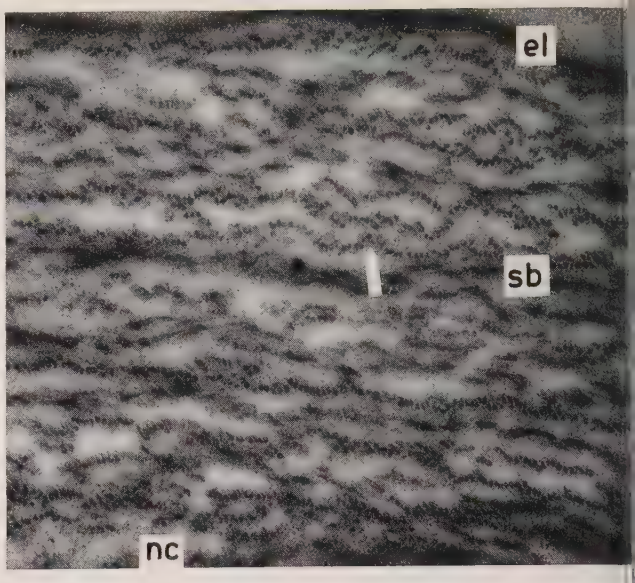


Fig. 2. *External sheath of the notochord* (32000 : 1): el = external layer with circular fibrils. The plies of the sheath body (sb) appear slightly folded (↓) and are composed of several layers of fibrils. The internal boundary is marked by epithelial cells of the notochord (nc).

Zusammenfassung. Auf Grund von elektronenmikroskopischen Beobachtungen wird nachgewiesen, dass die Basalmembran der Epidermis und die äussere Chordascheide im Schwanz von *Xenopus*larven eine übereinstimmende Feinstruktur besitzen; sie ist gekennzeichnet durch orthogonal angeordnete Kollagenfibrillen.

R. WEBER

Zoologisches Institut der Universität, Bern (Switzerland), May 5, 1961.

Beat to Beat Analysis of the Radiocardiogram

In radiocardiography the impulses from the precordial detector are usually fed into a ratemeter with a direct-writer (PRINZMETAL, CORDAY, SPRITZLER, and FLIEG[1], VEALL, PEARSON, HANLEY, and LOWE[2], PIETILÄ and HAKKILA[3]). The inertia of this type of recording makes it difficult to register correctly rapid changes in radiation intensity such as the dilution of a radioactive indicator in determinations of cardiac output. The inertia of the ratemeter makes it impossible to record correctly the changes in the radioactivity of the radiocardiogram during individual heart cycles. The disadvantages of the ratemeter can be avoided if the impulses from the detector are recorded on a tape recorder running at a high speed (BERNE, HALLBERG, and LINDELL[4]). The magnetic tape can then be analyzed when running at low speed, using an ordinary scaler. In this way the activity, during time intervals corresponding to 0.075 sec at the original recording, may be correctly counted. This type of recording, which allows a 16-fold stretching of the time axis, is free of inertia and will accept up to 10^7 impulses/min. The record may be analyzed repeatedly using different counting intervals, if this is desirable. Moreover, using a double printer, recording alternate intervals, the system can be fully automatized.

Such a tape recorder was used in the present experiments. It has 3 channels, one of which was used to record the pulses from a precordial scintillation detector. Another channel was used to register the pulses from a scintillation detector through which arterial blood was sucked at constant speed. This record was used to calculate cardiac output (BERNE et al.[4]). The R waves of the electrocardiogram were fed into the third channel of the tape recorder. The experiments were carried out in anaesthetized dogs, lying on their right side. The precordial detector was placed over the heart from above with the help of fluoroscopy. The collimation was such that the detector 'saw' the whole heart and as little as possible of the surrounding tissues. Arterial blood, for the determination of cardiac output according to the indicator dilution technique, was drawn from a femoral artery. Radioactive potassium iodide (I^{131}) in saline solution was injected intravenously in doses of 10 μC.

In the semiautomatic analysis of the record in this study, the first R wave after the injection started the counter. As many 0.075 sec intervals as possible were counted between the R waves. An indetermined time interval (< 0.075 sec) preceding each R wave was omitted in the record (Figure 1).

The records from an experiment are shown in Figure 1. It may be seen that there is a decrease in the radioactivity recorded by the precordial detector about 0.1 sec after the R wave in the electrocardiogram. This decrease is a regular phenomenon and it is fairly constant for 3 heart cycles, during the passage of the radioactive bolus through

[1] M. PRINZMETAL, E. CORDAY, R. J. SPRITZLER, and W. FLIEG, J. Amer. med. Assoc. *139*, 617 (1949).
[2] N. VEALL, J. D. PEARSON, T. HANLEY, and A. E. LOWE, Radioisotope Conf. *I*, 183 (1954).
[3] K. A. PIETILÄ and J. HAKKILA, Cardiologia *36*, 97 (1960).
[4] E. BERNE, L. HALLBERG, and S. E. LINDELL, Scand. J. lab. clin. Invest., in press (1961).

the right heart. Some seconds later similar changes in radiation intensity are recorded as the injected I^{131} passes through the left heart. The heart did not move out of the field seen by the detector during any phase of the heart cycle, as judged by fluoroscopy. The decrease in radioactivity occuring during systole must therefore represent radioactivity leaving the heart, i.e. the stroke volume. The mean stroke volume could be calculated from the measurement of cardiac output, according to the indicator dilution principle, and was found to be 18.6 ml. It was thus possible to calibrate the systolic decrease in radioactivity in ml blood. The radioactivity recorded by the precordial detector at the end of systole should represent the amount of blood remaining in the volume 'seen' by the detector. With the collimation used, this radioactivity was confined mainly to the heart, at least during the passage of the radioactivity through the right heart. If, during the 3 heart cycles studied, the concentration of radioactive iodine is assumed to be evenly distributed between the blood leaving the heart with each systole and that remaining in the heart, then it should be possible to calculate the volume of blood remaining in the right heart at the end of systole. In the present experiment, the volume of blood in the right heart at the end of systole was calculated to be 12 ml. Similar calculations might be made for the left heart. Here, however, more of the radioactivity seen by the detector at the end of systole is likely to come from blood outside the half of the heart studied. If this objection is neglected, then the amount of blood remaining in the left heart at the end of systole may be estimated to be 12 ml.

For comparison, the tape record was also analyzed in 0.75 sec intervals without any correlation to the R waves, as described in a previous paper (Figure 2).

The radiocardiogram has been used in measurements of circulation times, such as the minimal pulmonary circulation time (Waser and Huntzinger[5]). This is the time between the entrance of the radioactive bolus into the right heart and its entrance into the left heart (A-A in Figure 1). Obviously these points can be more accurately assessed in this record than in Figure 2.

Zusammenfassung. Ein 3-Kanal-Magnetbandgerät ist für die gleichzeitige Registrierung von Electrocardiogramm und Radiocardiogramm verwendet worden. Die Methode ermöglicht das Studium der Veränderungen des Blutvolumens des Herzens während eines Schlagcyclus. Dadurch können Schlagvolumen und Residualvolumen der beiden Herzkammern getrennt gemessen werden.

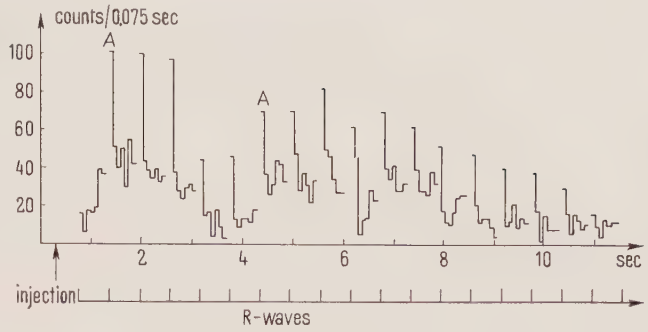


Fig. 1. Radiocardiogram recorded synchronously with the R waves of the electrocardiogram. A-A points of entry of radioactive blood in right respectively left heart.

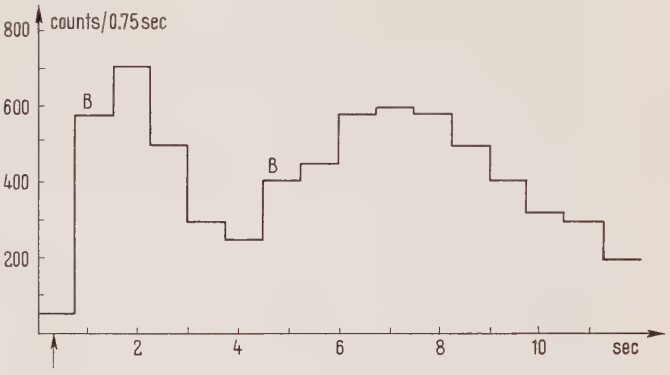


Fig. 2. Radiocardiogram of Figure 1 recorded independent of R waves of the electrocardiogram. B-B points of entry of radioactive blood in right and left heart respectively.

E. Berne, L. Hallberg, and S. E. Lindell

Departments of Radiotherapy, Internal Medicine and Clinical Physiology, Sahlgren's Hospital, University of Göteborg (Sweden), May 15, 1961.

[5] P. Waser and W. Huntzinger, Schweiz. Med. Wschr. *81*, 215 (1951).

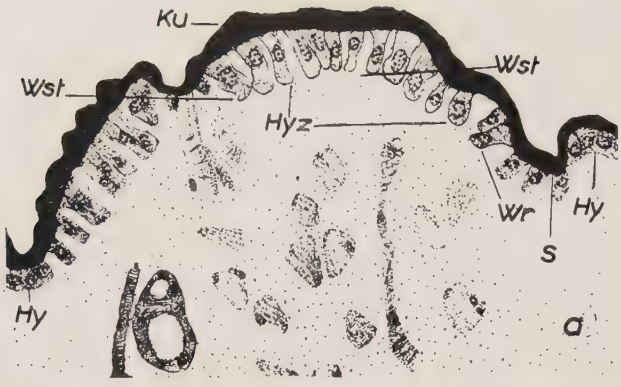
Atypische Wundheilungsvorgänge in der Haut von Großschmetterlingsraupen

Schnitt- und Brandwunden in der Haut werden bei vielen Insekten durch akkumulierte Blutzellen, die aus der Leibeshöhle stammen, provisorisch verschlossen[1]. Auch unter Brandstellen in der Haut von Mehlmottenraupen bildet sich in zahlreichen Fällen vorübergehend eine «Blutzellenhaut»[2]. Im Zuge eigener Untersuchungen an Schnittwunden in der Haut von Saturnidenraupen liessen sich nunmehr in Abhängigkeit von der Operationsart 2 verschiedene Formen der Wundheilung feststellen: die erste trat bei fast allen nach aussen hin offenen Hautwunden auf, die zweite vorwiegend bei den Hautdefekten, die nach aussen hin durch die Kutikula (Ku) abgedeckt blieben; solche entstanden zum Beispiel durch die Ablösung von Flügelanlagen an der Hypodermis.

Die erste bei Lepidopteren übliche Form der Wundheilung verläuft ohne Akkumulation von Blutzellen an der Wundstelle (Figur 1a, Wst). Die Wundränder (Wr) werden durch Muskelkontraktion einander genähert; von dort bis zur Segmentgrenze (S) lockert sich sodann der hypodermale Zellverband auf. Die einzelnen, azidophilen und grosskernigen Hypodermiszellen (Hyz) schwellen basalwärts an und schieben sich über die Wundfläche hinweg. So entsteht an dieser ein lückenhafter Zellbelag, der erst in der nächstfolgenden Mitosenperiode der Hypodermis (Hy) wiederum zu normaler Zelldichte ergänzt wird.

Die zweite Form der Wundheilung, bei Lepidopteren bis jetzt noch nicht bekannt, beginnt kurz nach der Ope-

[1] V. B. Wigglesworth, J. exp. Biol. *14*, 364 (1937).
[2] H. Braemer, Wilh. Roux' Arch. Entw.-Mech. Org. *148*, 362 (1955).



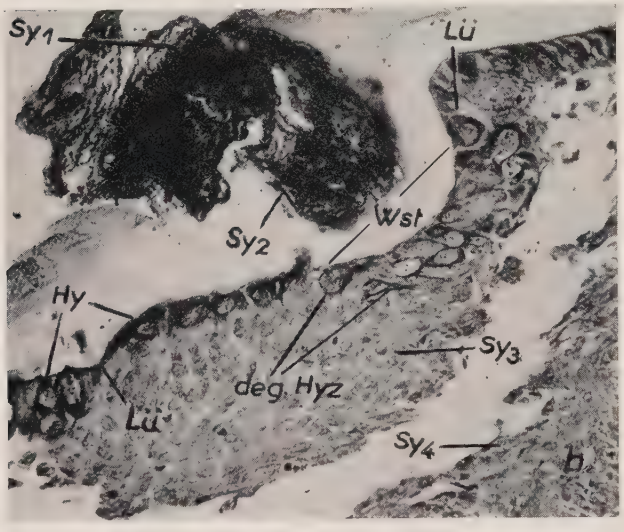


Fig. 1. (a) Normale Verheilung ohne Substratbildung; 6 Tage nach Exstirpation eines Hautstücks im Flügelsegment einer Raupe 2. Stadiums; nach 1 postoperativer Häutung, vor der Mitosenperiode des 3. Stadiums; Längsschnitt, Vergr. ca. 1:550; Kutikula schwarz. – (b) Substratbildung an der nicht verheilten Wundstelle, 18 Tage nach Ablösung einer Flügelanlage des 2. Stadiums von der Hypodermis; nach 2 postoperativen Häutungen, vor der Mitosenperiode des 3. Stadiums; Mikrofoto, Querschnitt durch das Flügelsegment; Vergr. ca. 1:300.

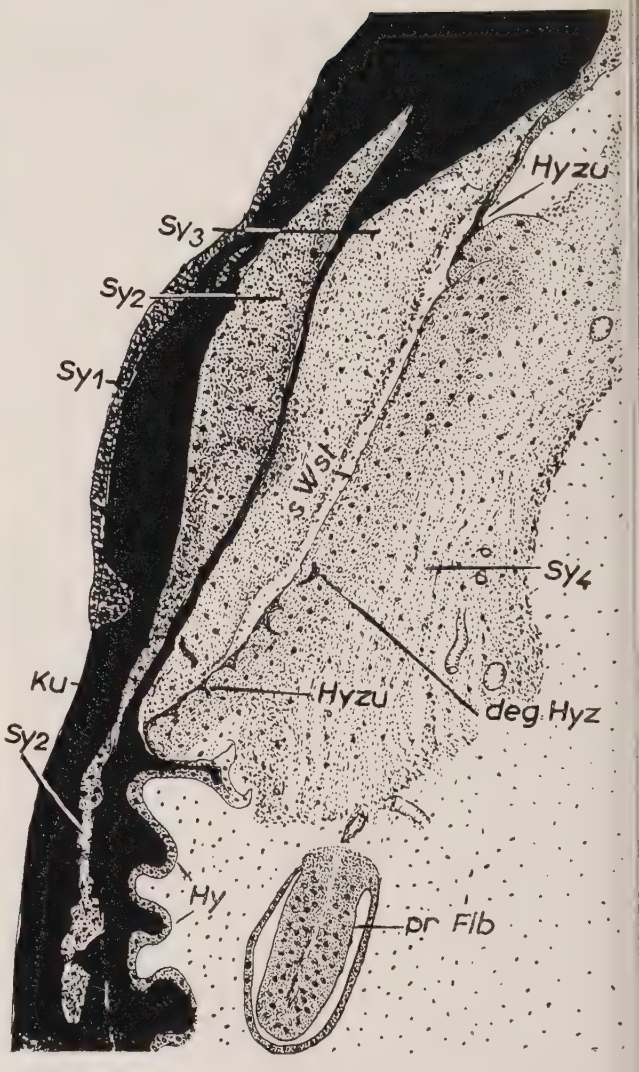


Fig. 2. Substratbildung an einer sekundär erweiterten Wundstelle in der Hypodermis. 34 Tage nach der Ablösung der Flügelanlage von der Hypodermis, nach 2 postoperativen Häutungen im letzten Raupenstadium; Kutikula schwarz, Querschnitt durch die Raupe. Vergr. ca. 1:30.

ration mit einer Ansammlung spindelförmiger Blutzellen unter der Wundstelle (Figur 1b). Diese entstehen nicht nur aus den Proleukozyten in der Leibeshöhle, sondern auch in dem die Flügelanlage umgebenden Blutzellensäckchen, welches im Falle der Figur 2 gänzlich verschwunden ist. Derartige Blutzellen legen sich sodann zu langen Zellbändern aneinander und verschmelzen zu dauerhaften, bindegewebsartigen Synzytien (Figur 2, Sy_4). Diese nehmen hier gewissermassen die Stelle des Bindegewebes ein, welches bei anderen Insekten, so zum Beispiel bei Koleopteren, die Hypodermis unterlagert und unter den Wundstellen ein Substrat bildet, das durch eine «Hypodermiszunge» (Figur 2, Hyzu) von den Wundrändern aus überwachsen wird[3]. Bei Lepidopteren jedoch wird ein solcher Überwachsungsversuch der Hypodermis über das Substrat durch gewebezerstörende Vorgänge immer wieder abgestoppt (Figur 2); selbst bei kleinen Wundstellen läuft keine kontinuierliche Lage von Hypodermiszellen mehr über das Synzytium hinweg. Die Hypodermis bleibt hier lückenhaft (Figur 1b, Lü), da immer wieder einzelne Hypodermiszellen sich spindelförmig abflachen, in das Synzytium einwandern und dort degenerieren (Figur 1b und 2, deg.Hyz). Auch kann die ursprüngliche Wundstelle sekundär stark erweitert werden, indem 1–3kernige Phagozyten in die Hypodermis am Wundrand eindringen und diese zerstören (Figur 2, s. Wst). Dazu kommt, dass degenerierende Substratschichten durch synzytiale Neubildungen von der Leibeshöhle her nach aussen in die Kutikula abgedrängt werden (Figur 1b und 2, Sy 1/2 und Sy 3/4).

Abkürzungsschlüssel: deg. Hyz = degenerierte Hypodermiszellen. Hy = Hypodermis. Hyzu = zungenförmig über das Substrat vorwachsende Hypodermis. Ku = Kutikula. Lü = Lücke im Zellverband der Hypodermis. pr. Flb = präsumptives Flügelblatt. S = Segmentrand. Sy_{1-4} = Synzytienbildungen, die zeitlich aufeinanderfolgen. Wr = Wundrand. Wst = (sekundäre) Wundstelle.

Dieses pathologische Wechselspiel zwischen Gewebeaufbau und Gewebezerstörung verhindert hier offensichtlich eine normale Verheilung der Hypodermiswunden. Anstelle dessen vernarben diese unter fortschreitender Abnützung und Neubildung von synzytialen Substratschichten.

Nun neigen aber die Raupen von Saturniden im Unterschied zu denen von Sphingiden viel stärker zur Bildung

[3] T. M. LAZARENKO, Z. mikr.-anat. Forsch. *12*, 467 (1928).

derartiger Wundgewebe und ausserdem zu allerlei Entwicklungsstörungen[4]. Es besteht daher Veranlassung, diese heilungshemmenden Substratbildungen in die stattliche Anzahl atypischer Gewebsbildungen einzureihen, die, nach experimenteller Störung der inneren Sekretion, von PFLUGFELDER[5] insbesondere an Hemipteren beobachtet worden sind.

Résumé. Chez les chenilles de la famille de Saturnidés, lors d'une blessure de l'hypoderme, des cellules sanguines fusiformes empêchent la guérison typique par la formation d'un tissus cicatrisant des disques imaginaux de l'aile à l'endroit endommagé. La région originairement défectueuse est élargie par suite d'une destruction secondaire de l'hypoderme.

MARGA LEMPPENAU

Zoologisches Institut der Universität Saarbrücken (Deutschland), 2. September 1960.

[4] M. E. LEMPPENAU, Exper. *17*, 369 (1961).
[5] O. PFLUGFELDER, *Entwicklungsphysiologie der Insekten* (1958).

Entwicklungsstörungen bei Großschmetterlingen nach verschiedenen Operationen, insbesondere nach Implantationen von Gewebe- und Papierstückchen in die Leibeshöhle der Raupen von *Antheraea pernyi* Guér.

Wie vor allem die Versuche PIEPHOS an Kleinschmetterlingen zeigen[1], entwickeln sich Raupen des letzten Stadiums, denen inkretorisch tätiges Gewebe der Corpora allata bzw. des Gehirns aus dem dritt- oder vorletzten Raupenstadium in die Leibeshöhle implantiert worden war, recht häufig zu Mischformen zwischen Raupe und Puppe. – Im Laufe eigener Untersuchungen an rund 1000 Großschmetterlingsraupen traten neuerdings derartige Mischformen auch nach Verpflanzungen anderer Gewebestücke (darunter auch Flügelanlagen und Tracheenbögen) vor allem in die Leibeshöhle älterer Raupen von *Anth. pernyi* auf. So entwickelten sich nach Implantationen von Abdominalganglien des 3. und 4. Stadiums fast die Hälfte, nach solchen von Stigmen rund ein Drittel der operierten Raupen zu Mischformen, – ja, in einigen Fällen sogar nach Implantationen von Papierstückchen in die thorakale Leibeshöhle der Raupen. Keine Mischformen entstanden indessen nach Implantationen von Thorakalganglien und Raupengehirnen des 3. und 4. Raupenstadiums sowie nach der Setzung von Hautwunden, in denen keine grösseren, isolierten Gewebeteile zurückgelassen wurden.

Bei den Mischformen von *Vanessa urticae* (Nymphalidae) verblieben an dem raupenartigen, jedoch mit Puppenchitin (Figur 1, Pch) bedeckten Thorax die Raupenbeine (Rb); Puppenflügel, -beine und -antennen fehlten und waren nicht ausgestülpt worden. In einigen Fällen waren am Abdomen noch Kranzfüsse und darüber Teile der Raupenhaut erhalten geblieben.

Bei *Antheraea pernyi* traten ausser Dauerraupen und defekten Puppen (mit freien Antennen usw.) auch einige Puppen mit raupenähnlichen Köpfen auf. Bei 30 Mischformen mit sehr langer Entwicklungszeit waren an der Innenseite der 3 Puppenbeinpaare zusätzlich auch noch die 3 Raupenbeinpaare erhalten geblieben; erstere wurden demnach im Vorpuppenstadium aus ihren Peripodialsäcken ausgestülpt, obwohl letztere nicht zurückgebildet worden waren. Anstelle verschiedener, vor allem bei *Galleria melonella* beobachteter Übergangsformen zwischen Raupen- und Puppenbein manifestierte sich somit hier bei *Anth. pernyi* in Form larvaler Beinchimären eine doppelte Beingarnitur. – Mit solchen Mischformen zeigten nun aber auch die meisten Raupen von *Anth. pernyi*, die sich nach der Operation zu normalen Puppen entwickelten, eine auffallende Verlängerung ihrer postoperativen Entwicklungszeit im Vergleich zur Normalentwicklung; so konnte ein postoperatives Raupenstadium anstelle von 7–8 Tagen volle 21 Tage dauern, also um 13 Tage verlängert sein. Dabei wurde eine zeitliche Verzögerung der hypodermalen Mitosenperiode bis auf den 7. Tag nach einer Häutung

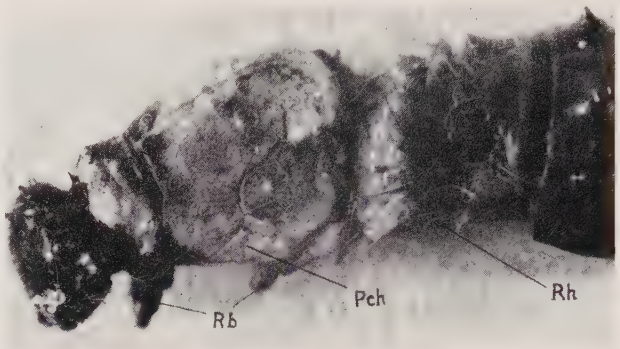


Fig. 1. Raupenpuppe von *Vanessa urticae*; der Thorax mit Puppenchitin, das Abdomen mit Raupenhaut bedeckt. Vergrösserung ca. 1/4.

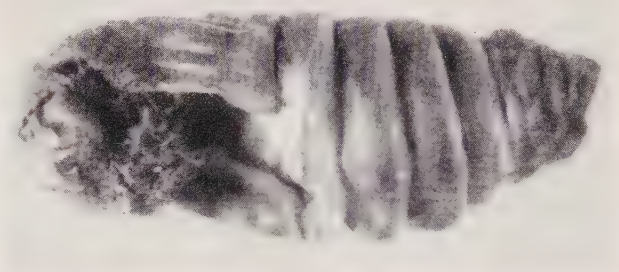


Fig. 2. Puppe mit Raupenkopf von *Antheraea pernyi*

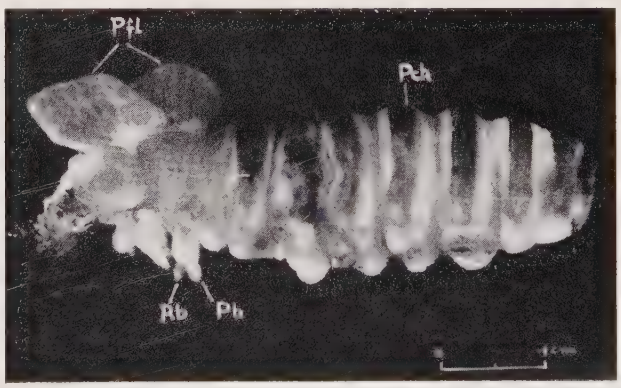


Fig. 3. Raupenpuppe von *Antheraea pernyi* mit inneren Raupen- und äusseren Puppenbeinen.

Abkürzungsschlüssel: Pb = Puppenbeine. Pch = Puppenchitin. Pfl = Puppenflügel. Rb = Raupenbeine. Rh = Raupenhaut. Rst = Raupenstadium.

[1] P. PIEPHO, Roux' Arch. Entw.-Mech. Org. *141*, 500 (1949).

beobachtet. (Offensichtlich waren die neurosekretorischen Zellen in der *pars intercerebralis* des Gehirns in ihrem normalen Tätigkeitsrhythmus gestört, zeigten diese doch zu einer Zeit vor der Häutung, da sie normalerweise kein Sekret mehr führen[2], in den untersuchten Fällen noch eine starke Anfärbbarkeit.) Die hier bei *Anth. pernyi* beobachtete Verlängerung der Entwicklungszeit stand jedoch nicht in Beziehung zu Regenerationsprozessen[3].

Eine Abkürzung der Stadiendauer nach Gehirnimplantationen[4] wurde bei *Anth. pernyi* in mehreren Fällen beobachtet, darüber hinaus auch nach Verpflanzung von Stigmen in die thorakale Leibeshöhle.

Bei *Sphinx ligustri* hingegen wurde auch nach anderen Operationsarten (zum Beispiel Exstirpation und Transplantation von Flügelanlagen) bei über der Hälfte der Raupen die Dauer eines postoperativen Raupenstadiums bis zu 4 Tagen verkürzt; bei einem Drittel derselben verlängerte es sich bis zu 6 Tagen, während die übrigen Raupen sich normal nach 7–8 Tagen häuteten.

Anstelle einer Verlängerung von postoperativen Raupenstadien war bei *Van. urticae* und *V. jo* eine Verkürzung derselben bis zu 4 Tagen zu beobachten. Überzählige Häutungen konnten nach der Operation bei allen hier untersuchten Arten auftreten: am seltensten bei *Sphinx ligustri*, am häufigsten bei *Anth. pernyi*.

Résumé. Chez des chenilles de macrolépidoptères, après des implantations dans la région thoracique on a obtenu 1° une durée de développement postopératoire plus longue (Saturnidés et Sphingidés), ou plus courte que la normale (Nymphalidés et Sphingidés); 2° des chenilles qui muent plus (Saturnidés) où ont une mue supplémentaire; 3° des chenilles qui ne se chrysalident qu'en partie (Saturnidés et Nymphalidés). – Dans plus de 30 cas les pattes de la chrysalide se formèrent à côté des pattes de la chenille qui ne se résorbèrent pas.

Marga Lemppenau

Zoologisches Institut der Universität Saarbrücken (Deutschland), 15. März 1961.

[2] M. Rehm, Roux' Arch. Entw.-Mech. Org. *145*, 205 (1951); Z. Zellforschg. *42*, 19 (1955).

[3] H. J. Pohley, Roux' Arch. Entw.-Mech. Org. *152*, 183 (1960).

[4] M. Ichikawa und J. Nishitsutsuji, Annot. Zool. Jap. *24*, 20 (1951).

The Induction of Tolerance in Hamsters to Transplants of Mouse Sarcoma by Means of Heteroparabiosis

Previous research on the influence of homoioparabiosis on the transplantability of neoplasms has shown that by parabiosis both sensitivity and immunity may be transmitted to transplants of neoplastic tissue. Cloudman[1] observed that $C_{57}BL$ mice in parabiosis become sensitive to hepatoma C_{198}, just like crosses of the F_1 generation (C_{57} leaden × $C_{57}BL$ non-sensitive). The author has given the name of pseudohybridization to this process of changes under the influence of parabiosis. Harris[2] showed that by parabiosis transplantation immunity may also be transmitted to the second partner.

The research here reported was undertaken with the aim of inducing tolerance in hamsters to transplants of Crocker's mouse sarcoma 180 by means of heteroparabiosis. Since in mouse-hamster heteroparabiosis[3] the parabiotic immunization of the hamsters most frequently occurs, an attempt has been made to show whether immunological enhancement[4] of a neoplasm may be obtained in this way by transplanting neoplastic tissue from one species of animal to another.

Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) of both sexes, two months old and of our own breeding, were joined in heteroparabiosis with unrelated female white mice without any transplant of sarcoma 180 or with an already developed subcutaneous Crocker's sarcoma. Severe anaemia and the death of the mouse parabiont most frequently occurred after 4, 5, or 7 days of heteroparabiosis. The hamsters were then released from heteroparabiosis and 5, 8, and 10 days after separation, transplants were made of Crocker's sarcoma 180. Pieces of the sarcoma transplants were subcutaneously grafted into the hamsters with a trocar under the most aseptic conditions possible. No vascular connection between the two parabionts was observed on separation of the hamsters from heteroparabiosis. In heteroparabiosis, only the coeliac cavities of the two partners communicated. Some parabiotic hamsters, in which histological examination confirmed that the sarcoma transplant had 'taken', were injected intraperitoneally 8 days after transplantation with spleen homogenizate taken from the mouse bearing the tumor. The neoplastic transplants in the hamsters were controlled to see if they 'took' by making histological preparations or smears on slides at varying intervals of time after transplantation.

As controls 30 single hamsters (20 females and 10 males) were used; these received subcutaneous transplants of Crocker's sarcoma. A second control was provided by 20 hamsters (15 females and 5 males), which received a subcutaneous transplant of sarcoma 180 on the eighth day after the second injection of mouse spleen homogenizate.

In all single control hamsters, inflammation and leucocyte infiltration at the site of the implanted neoplastic tissue were observed between the third and fifth day after transplantation. In control hamsters which received injections of mouse spleen homogenizate, growth of the neoplasm up to the 28th day after transplantation, followed by regression, was observed in 5 females.

As the experiment has shown, mouse-hamster heteroparabiosis has no influence on neoplastic growth in the parabiotic hamster. The influence of heteroparabiosis on the growth of neoplasms in parabiotic hamsters is shown when these are joined in parabiosis with mice previously injected subcutaneously with sarcoma 180. In all parabiotic hamsters which were joined to mice from 30 to 40 days after transplantation of sarcoma, the implanted Crocker's sarcoma grew in the subcutaneous tissues up to 38 days and then underwent regression. This effect of growth in the sarcoma is still more intensive when mouse-spleen homogenizate is given to the parabiotic hamsters after transplantation. The sarcoma transplants are then maintained in the hamsters up to 102 days and do not undergo regression (Table I and II).

On the basis of these results, it may be assumed that immunological enhancement of mouse sarcoma in hamsters may be obtained by heteroparabiosis when immunization occurs in the hamsters with the formation of both erythrocytic antibodies and of neoplastic antibodies, of which a sufficiently high level conditions the growth of sarcoma in separated parabiotic hamsters.

[1] A. M. Cloudman, Cancer Res. *3*, 47 (1943).

[2] M. Harris, Cancer Res. *3*, 546 (1943).

[3] B. Konieczna-Marczyńska and A. Skowron-Cendrzak, Exper. *16*, 463 (1960).

[4] N. Kaliss, Cancer Res. *18*, 992 (1958).

Tab. I

Number of parabiotic hamster	Duration of heteroparabiosis in days	Time of survival of sarcoma transplants in parabiotic mice in days	Results of transplantation Time of survival of sarcoma transplants in parabiotic hamsters
13b	2	12	failed to 'take'
14b	4	12	failed to 'take'
15b	4	12	failed to 'take'
43A	5	13	failed to 'take'
16b	4	13	failed to 'take'
26a	7	14	failed to 'take'
19b	5	15	failed to 'take'
27b	4	15	failed to 'take'
2a	6	16	failed to 'take'
7a	5	18	failed to 'take'
28a	4	19	failed to 'take'
12b	5	20	failed to 'take'
28A	4	20	failed to 'take'
21b	4	20	failed to 'take'
51A	4	20	failed to 'take'
17b	1	20	failed to 'take'
32A	1	26	failed to 'take'
40b	6	29	35 days and regression
130A	3	29	21 days and regression
1	4	30	38 days and regression
3	5	31	20 days and regression
31b	3	32	22 days and regression
139A	4	32	30 days and regression
118A	4	32	30 days and regression
143b	4	33	23 days and regression
10a	4	46	30 days and death

Tab. II

Number of parabiotic hamster	Duration of heteroparabiosis in days	Time of survival of sarcoma transplants in parabiotic mice in days	Results of transplantation Time of survival of sarcoma transplants in parabiotic hamsters injected with mouse spleen homogenizate
50A	4	31	38 days and death
39A	4	32	37 days and death
30A	3	32	43 days and regression
43b	4	33	102 days and death
18A	4	40	30 days and death
12a	3	42	46 days and death
14a	4	46	72 days and death

Zusammenfassung. Durch die Heteroparabiose Maus-Hamster wurde bei den Hamstern Toleranz auf Crockers Maussarkoma hervorgerufen. Der induzierende Einfluss der Heteroparabiose konnte nur dann beobachtet werden, wenn bei den parabiotischen Mäusen die vorher implantierte Geschwulst gut entwickelt war. Die heterotransplantierte Geschwulst zeigte ein rasches Wachstum nur dann, wenn Milzhomogenat einer geschwulsttragenden Maus in parabiotische Hamster injiziert worden war.

Barbara Konieczna-Marczyńska

Department of Biology and Embryology, Medical Academy, Kraków (Poland), April 17, 1961.

Untersuchungen an Ionenaustauschmodellen zum Verständnis der Physiologie biogener Amine.

Austauschversuche an einem schwefelsäuregruppentragenden Harz zum Verständnis von sogenannten Histaminliberationsvorgängen

Zahlreiche Arbeiten der Literatur befassen sich mit den physiologischen Funktionen körpereigener saurer Polysaccharide wie Heparin, Chondroitinsulfat usw.[1–5]. Diese Polyelektrolyte besitzen den Charakter von Ionenaustauschern, und es ist daher anzunehmen, dass sie auf Grund dieser Eigenschaft an vielen pharmakodynamischen Vorgängen beteiligt sind. So ist zum Beispiel bekannt, dass solche saure Polysaccharide Basen, wie etwa biogene Amine (Histamin, Serotonin usw.), in der Form von Gegenionen fixieren.

Im Organismus dürften saure Polysaccharide einerseits die Funktion von «Trägersubstanzen» besitzen, indem sie entweder in Depots lokalisiert vorliegen (zum Beispiel in Form der aminreichen Mastzellen) oder aber als Mucoproteine, das heisst als Polysaccharid-Eiweisskomplexe, zirkulieren; andererseits sind solche Polysaccharide und andere wohl auch in die Organrezeptoren eingebaut. Da sie in beiden Fällen als Ionenaustauscher wirken können, erscheint es von besonderem Interesse abzuklären, wie sich diese biogenen Ionenaustauscher allgemein verhalten und welche funktionsbestimmenden Eigenschaften sie besitzen. Es ist anzunehmen, dass sich Depotpolysaccharide entsprechend ihrer unterschiedlichen physiologischen oder pharmakodynamischen Reaktivität von Rezeptor-Polysacchariden nicht nur durch ihre Polysaccharidstruktur, sondern auch durch die Natur ihrer ladungstragenden Gruppen unterscheiden. So befinden sich beispielsweise in der Magenschleimhaut saure Mucopolysaccharide mit Schwefelsäuregruppen, während die Zellwände in den Geweben mancher Organe die carboxylgruppentragende Neuraminsäure in Form von Kohlehydrat-Eiweisskomplexen[6] enthalten. Ebenso weist die Tatsache, dass schwefelsaure Polysaccharide in Organen mit Entgiftungsfunktion (zum Beispiel Leber) in hoher Konzentration vorliegen, darauf hin, dass Polyelektrolyte an den spezifischen Funktionen solcher Organe massgebend beteiligt sein können.

Um über die physiologische und pharmakologische Bedeutung von im Körper ablaufenden Ionenaustauschvorgängen Aufschluss zu erhalten, erscheint es vorerst von Vorteil, anstelle der meist nicht in genügender «Reinheit» vorliegenden biogenen Austauscher synthetische Ionenaustauscher[7] als Modelle für körpereigene Depots bzw. Organrezeptoren heranzuziehen. In einer ersten Reihe von Versuchen wurde eine bestimmte Menge eines Ionen-

[1] H. Gibian, *Mucopolysaccharide und Mucopolysaccharidasen* (Deuticke Verlag, Wien 1959).
[2] R. D. Higginbotham und T. F. Dougherty, Fed. Proc. *16*, 58 (1957).
[3] R. Keller, Arzneimittel-Forschung *8*, 390 (1958).
[4] J. F. Riley, Endeavour *19*, 4 (1960).
[5] E. Werle und R. Amann, Klin. Wschr. *34*, 624 (1956).
[6] A. Gottschalk, Nature *186*, 949 (1960).
[7] H. Deuel und K. Hutschnecker, Mitt. Lebensmittelunters. Hyg. *46*, 11 (1955).

austauschers mit schwefelsauren Gruppen[8] in der H^+-Form jeweils mit einer Lösung geschüttelt, die neben Histamindihydrochlorid auch das Hydrochlorid einer anderen Substanz je in der Valzahl enthielt, die gleich der Kapazität der eingesetzten Menge des Ionenaustauschers war. Nach der Einstellung des Gleichgewichtes wurde durch die Anwendung der mittels potentiometrischer Titration erhaltenen Kurven bestimmt, zu wieviel Prozent die jeweilige Substanz neben Histamin vom Ionenaustauscher aufgenommen worden war[9]. Es wurde so eine durch Prozentwerte charakterisierte Selektivitätsreihe, bezogen auf Histamin als Bezugssubstanz, erhalten, wobei die Zahl also angibt, wieviele von 100 sauren Gruppen des Ionenaustauschers von Gruppen der diesbezüglichen Substanz neben Histamin besetzt worden sind.

Prozentuale Äquivalentverteilung als Mass für die Selektivität gegenüber Histamin am schwefelsauren Dowex-Ionenaustauscher:

(1)	*d*-Glucosamin · HCl	5%
(2)	NH_4Cl	12%
(3)	NaCl	13%
(4)	KCl	15%
(5)	MgCl	17%
(6)	Adenin · 2 HCl	33%
(7)	Adrenalin · HCl	37%
(8)	$CaCl_2$	37%
	Histamin · 2 HCl	50%
(9)	Priscol · HCl	56%
(10)	Mezcalin · HCl	58%
(11)	Tryptamin · HCl	68%
(12)	Pyribenzamin · 2 HCl	76%
(13)	Spermin · 4 HCl	80%
(14)	*n*-Octylamin · HCl	86%
(15)	Privin · HCl	88%
(16)	Antistin · HCl	91%

Alle Substanzen mit Werten oberhalb 50% sind bezüglich unserer Versuchsanordnung als Histaminliberatoren zu bezeichnen. Dieser Befund deckt sich weitgehend mit den im Tierversuch zu beobachtenden Wirkungen, indem unter Vernachlässigung anderer pharmakodynamischer Eigenschaften *in vivo* die gleichen Substanzen als Histaminliberatoren imponieren oder – zumindest an gewissen Rezeptoren – histaminähnlich wirken können. Die unterhalb 50% stehenden Substanzen sind weder im Harzversuch noch allgemein am Tier als typische Histaminliberatoren anzusprechen. Bietet man neben Histamin eine andere Substanz in grossem Überschuss an, so können unter diesen Umständen auch solche Substanzen zu einer Verdrängung von Histamin führen.

Ganz allgemein liefern die bisher vorliegenden Versuchsergebnisse Anhaltspunkte über Austauschvorgänge, wie sie an Depotstrukturen ablaufen dürften: Mit Hilfe einer einfachen Versuchsanordnung lassen sich Verbindungen im Hinblick auf ihr Histaminliberationsvermögen charakterisieren. Ausserdem geben diese Untersuchungen wertvolle Auskünfte über die Resorptionsvorgänge in saurem Milieu gegenüber Ionenaustauschmembranen, wie sie zum Beispiel im Magen anzutreffen sind.

Betrachtet man die angegebene Selektivitätsreihe, so fällt besonders auf, dass die beiden Antihistaminika Antistin und Pyribenzamin als hervorragende Histaminliberatoren erscheinen. Beide Verbindungen vermögen Histamin am schwefelsauren Ionenaustauscherharz zu mehr als 75% einzutauschen. Der Schluss liegt nahe – und er steht nicht im Widerspruch zu *in vivo*-Resultaten –, dass es Verbindungen gibt, die zwar in Depots vorhandenes Histamin freizusetzen, am Erfolgsorgan dagegen die Rezeptorengruppen für den Zugang von Histamin zu sperren vermögen. Dass Antihistaminika Histamin freizusetzen vermögen, wurde übrigens auch von ARUNLAKSHANA[10] in Versuchen an isoliertem Lungengewebe festgestellt, wobei zum Beispiel Benadryl etwa gleich wirksam war wie der bekannte starke Histaminliberator «Compound 48/80». Für eine Testierung von Substanzen im Hinblick auf ihre Fähigkeit, mit biogenen Stoffen (Histamin, Serotonin, Adrenalin, Noradrenalin) in Wechselwirkung zu treten, ist demnach sowohl ein Depotmodell als auch ein Erfolgsmodell notwendig: Austauschversuche an Ionenaustauschsystemen mit Carboxylgruppen (Acrylsäureharze, Speichelmucoproteine, Formylpektine) und mit Ampholytcharakter (Proteine) werden zur Zeit in den Kreis der Untersuchungen einbezogen.

Summary. Mixtures of histamine and other basic substances as hydrochlorides were added in equivalent amounts to an acid ion exchange system containing SO_3^--groups in the H^+-form (Dowex 50 W × 2). After completion of the equilibrium, the amounts of both the free histamine and the competing substance were determined by potentiometric titration.

Values are presented for the relative amounts of each substance which are retained by the resin.

The results obtained show that histamine and a given competing substance are selectively distributed on the resin. The method may be useful as a test for the possible histamine-liberating capacity of biologically important substances.

K. KÜTTNER, H. MAJER, G. HUBER und R. JAQUES

Forschungslaboratorium der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, 21. April 1961.

[8] Dowex 50 W × 2 (200–400 mesh), Kapazität 5 mÄqu./g trockenes Harz.

[9] Weitere methodische Einzelheiten vergleiche K. KÜTTNER, Dissertation Bern (1961).

[10] O. ARUNLAKSHANA, J. Physiol. *119*, 47 P (1953).

STUDIORUM PROGRESSUS

Interaction of *t* Alleles at the *T* Locus in the House Mouse[1,2]

Studies of the complex *T* locus in the 9th chromosome of the house mouse have revealed a series of interesting facts[3]. The interactions of the dominant gene, *T*, with its numerous recessive alleles and of the different recessives with each other are of particular interest. *T* and several of the recessives are lethal when homozygous and the different homozygotes die at different stages in development. *T* in combination with any of these recessive lethal

[1] This work was supported in part by Research Grant B-931 from the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service, and in part by a grant-in-aid from the American Cancer Society.

[2] Part of the data reported in this paper were submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Arts at Bryn Mawr College, Bryn Mawr, Pa., by ANNA C. PAI who would like to express her deepest appreciation to Professor JANE M. OPPENHEIMER for her guidance during the course of the work.

[3] S. GLUECKSOHN-WAELSCH, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology *19*, 41 (1954).

alleles shows complementarity of gene action and heterozygotes are viable and tailless; therefore, matings of tailless animals heterozygous for T and one of these recessive lethal genes represent a balanced lethal system:

tailless	Tt	×	tailless	Tt
TT	Tt		Tt	tt
lethal at 10 days	viable	and	tailless	lethal

Because of this balanced lethal system identification of new t alleles is possible and is based on the fact that different t genes show complementarity of their effects so that compounds of any two different t alleles are viable and normal tailed [4], although males are sterile.

In studies of crosses between the balanced lethal lines A (Tt^0) and 29 (Tt^1), the following results would be expected:

tailless	Tt^0	×	tailless	Tt^1
TT	Tt^0		Tt^1	t^0t^1
lethal	tailless		tailless	normal-tailed viable

Earlier studies [5] have shown that T and t gametes segregate abnormally in the male resulting in an excess of offspring with the recessive t allele. In the present case, such abnormal segregation in the male with an excess of t-gametes should lead in interline crosses to a modification of the expected ratio of 2 tailless: 1 normal-tailed offspring in the direction of 1 tailless: 1 normal-tailed. However, a deficiency rather than an excess of the normal-tailed t^0t^1 compounds was observed by DUNN and GLUECKSOHN-SCHOENHEIMER [6] in studies of crosses between tailless lines A (Tt^0) and 29 (Tt^1), which gave 846 tailless to 359 normal-tailed offspring. They interpreted this small but significant deficiency as being due perhaps to prenatal interaction of t^0 and t^1 resulting in abnormal development and subsequent prenatal death of t^0t^1 embryos, and they offered some preliminary data in support of this hypothesis.

Recently this problem was subjected to further study. Interline matings of animals of several tailless lines, 29, A, 12, 9, 3, gave the results mentioned in Table I.

In these data a deficiency of normal tailed offspring is found in crosses involving tailless lines A, 29, 12, and it is most obvious in the crosses between $Tt^1 \times Tt^0$, in which only 17 of 744 progeny were normal tailed. This deficiency is far in excess of that reported previously and cited above.

Two different tailless lines A (Tt^0) were used in these experiments. Animals of one of these lines (line A1) gave 453 tailless: 1 normal tailed offspring in crosses to animals of tailless line 29. This one normal tailed offspring might well have been the result of a new t mutation the frequency of which DUNN and GLUECKSOHN-WAELSCH [4] calculated to be about one in 500. Mice of the other tailless line A (A2) gave 274 tailless: 16 normal tailed offspring in crosses to tailless line 29. The distribution of the normal tailed offspring among the different litters was as follows: 6 appeared singly, one litter had 5, one litter 3, and another 2 normal tailed viable offspring.

Although we shall not attempt here a further analysis of the difference in frequency of normal tailed offspring in the two different A lines used, one might perhaps speculate that prenatal survival of normal tailed t^0t^1 compounds depends on modifiers which differ in the two A strains. In any case, the frequency of normal tailed compounds in intercrosses of lines A and 29 in the present experiment is considerably lower than that observed in previous interline crosses cited above, and raises the suspicion that the recessive alleles t^0 and t^1 of lines A and 29 no longer show complete complementarity. Consequently, a balanced lethal system seems to exist in crosses between tailless line 29 and tailless line A1, whereas line A2 permits a certain proportion of 'escapers' (HADORN) to survive to term.

Although the greatest deficiency of normal tailed offspring appears in intercrosses of lines 29 and A, crosses of both of these lines to tailless line 12 also resulted in a deficiency, though less pronounced, of normal tailed progeny. In crosses of lines A and 29 to tailless lines 9 and 3, however, no such deficiencies were observed. This indicates that the deficiency of t^0t^1 normal tailed offspring is probably not due to abnormal gametic segregation in the parents, but to interaction of t^0 and t^1 alleles during development. Therefore, the possible embryonic interaction of t^0 and t^1 was subjected to further study.

For this purpose females and males of lines A and 29 were mated with each other. Twenty-seven litters timed by the vaginal plug method were dissected between the 9th and 14th days of gestation. The results are shown in Table II.

Of the 215 embryos studied, 59 were resorbed; 29 did not fall into the easily distinguishable classes of TT (lethal) [7], Tt (tailless)) or normal tailed embryos. These 29 embryos were smaller and less developed than their littermates. Some of them were retarded by approximately 24–48 h in comparison with their normal littermates, but manifested no specific abnormalities and were classified as

Tab. I. Results of interline crosses between tailless lines 29, A, 12, 9, 3

	Tt^1		Tt^0		Tt^{12}		Tt^9		Tt^3	
	o^t	n^t	o^t	n^t	o^t	n^t	o^t	n^t	o^t	n^t
Tt^1			383	13	39	4	113	85	69	93
Tt^0	344	4			29	7	20	7	6	7

Tab. II. Results of dissections of embryos from interline matings of mice of tailless lines A(Tt^0) and 29(Tt^1)

	No. of litters	age (days)	T/T	Embryos normal		abnormal		small	resorbed	Total
♀ Tt^1 × ♂ Tt^0										
	3	9 - 9½	5(4?)	7		2		4	7	25
	8	10–10½	9	23		6		4	15	57
				o^t	n^t					
	4	11–11½	7	12	3	5		1	6	34
	2	12–12½	2	4	—	1		—	4	11
	1	13–13½	—	6	—	—		—	2	8
	1	14–14½	—	4	—	—		—	7	11
Total	19			26	30	3	14	9	41	146
♀ Tt^0 × ♂ Tt^1										
	3	10–10½	4	14		1		3	5	27
				o^t	n^t					
	3	11–11½	3	9	6	2		—	3	23
	2	13–13½	1	8	—	—		—	10	19
Total	8		8	17	14	6	3	3	18	69

[4] L. C. DUNN and S. GLUECKSOHN-WAELSCH, Genetics *38*, 261 (1953).
[5] L. C. DUNN and S. GLUECKSOHN-SCHOENHEIMER, Genetics *24*, 587 (1939).
[6] L. C. DUNN and S. GLUECKSOHN-SCHOENHEIMER, Genetics *28*, 29 (1943).
[7] P. CHESLEY, J. exp. Zool. *70*, 429 (1935).

'small'; others showed atypical development of the head and neural structures and were classified as 'abnormal'. In view of a certain amount of variation in developmental stages and in size between littermates occurring normally, it is not possible to assign a particular genotype to the 'small' embryos.

Dunn and Gluecksohn-Schoenheimer[6] reported that 'abnormal' embryos from crosses of lines A by 29 were smaller and less developed than their tailless littermates and that they had abnormalities involving anterior structures, e.g., microcephaly, microphthalmia, and anencephaly. In the present study of embryos between the ages of 9 and $12^1/_2$ days, 11 were found with head abnormalities, 17 with abnormal neural structures, and 5 with herniated hearts, some of the embryos possessing more than one atypical structure.

Most of the animals with abnormal head structures appeared to be microcephalic and two possessed abnormal mandibular arches. Abnormal neural structures included asymmetrical neural folds in embryos that had not developed beyond the neural fold stage. Two additional embryos had allantois which had apparently failed to join the chorion at earlier stages.

The results of this study as well as of the previous one[6] seem to indicate that interaction of t^0 and t^1 during embryogeny varies in severity. At one extreme, death of t^0t^1 compounds may occur at very early stages, as evidenced by the large number of sites of resorption found in litters of interline crosses on the 9th day of gestation. At the other extreme, some t^0t^1 compounds are viable and normal tailed at term. Between these two extremes spreads the 'abnormal' group with a wide range of abnormalities leading to death of embryos at different stages. This is in distinct contrast to the sharp phase specificity shown by embryos homozygous for either recessive allele which die at definite stages of development[3].

The same lack of sharp phase specificity of effect was reported in an investigation of a group of genetically similar lethal t alleles extracted from different populations of wild house mice, where the homozygous recessive condition of each allele led to a lethal period extending between 8–10 days[8]. Abnormal embryos showed a wide range in degree of differentiation, some developing no farther than the egg cylinder stage, while others formed extraembryonic membranes.

In our present study control embryos for comparison with those dissected from interline crosses were obtained from matings within line 29. Previous investigations had shown the t^1 allele to be a preimplantation lethal[9], but in the present study resorption sites were found for 33 of a total of 85 embryos between 8–$12^1/_2$ days, indicating death of such embryos after implantation. Numerically, the proportion of resorbed embryos may well account for the t^1 homozygous class. In addition, the average number of embryonic sites of 9.4 at time of dissection appears rather high for a preimplantation lethal.

These results open the possibility that our tailless line 29 carries a new t allele (t^x) which acts as an early postimplantation lethal and which arose sometime in the past history of our Tt^1 line. Since t^x would be indistinguishable from t^1 in its interaction with T in producing taillessness, it could have been carried through one of the narrow bottlenecks that frequently develop in the course of breeding as difficult a strain as this tailless one with two lethal genes.

If the indications of the presence of a new mutation in line 29 can be confirmed, it would explain some of the differences between earlier studies by Dunn and Gluecksohn-Schoenheimer[6], and the present investigation. Therefore, the identification of the recessive alleles involved in the crosses reported here will be the subject of an extensive developmental study.

Zusammenfassung. Mehrfach wurde gezeigt, dass zwei rezessive letale Allele in der Hausmaus (t^0 und t^1) lebensfähige normale Tiere in heterozygoter Kombination t^0/t^1 produzieren. Neuere Daten machen wahrscheinlich, dass das t^1-Allel mutativ abänderte, so dass sowohl seine homozygote Wirkung als auch die Zusammenwirkung mit t^0 beeinflusst worden ist. Hingegen sind Kombinationen von t^0 und dem neuen Allel nicht mehr lebensfähig, und Homozygote sterben erst nach der Implantation.

Anna C. Pai and Salome Gluecksohn-Waelsch

Department of Anatomy, Albert Einstein College of Medicine, New York (U.S.A.), March 16, 1961.

[8] D. Bennett and L. C. Dunn, J. Morph. *103*, 135 (1958).
[9] S. Gluecksohn-Schoenheimer, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *39*, 267 (1938).

STUDIORUM PROGRESSUS

The Discrimination of Various Cystine Sulfoxides

A controversy exists concerning the constitution of cystine disulfoxide. Based on infrared spectral interpretation, Sweetman[1] deemed it to be cysteine thiolsulfonate (I). The isomeric symmetrical disulfoxide structure (II) was advanced by Lavine and Toennies[2] on the basis of its facile reduction to cystine.

Lavine and Toennies[2] have reported the synthesis of cystine disulfoxide by the oxidation of cystine perchlorate with perbenzoic acid in anhydrous acetonitrile. Emiliozzi and Pichat[3] have used performic acid in formic acid as the oxidant. It has now been found that both procedures produce both possible isomers. The method of Lavine and Toennies yields mainly the symmetrical disulfoxide, while that of Emiliozzi and Pichat affords as main product the thiolsulfonate. The two isomers can be distinguished by their decomposition points, the thiolsulfonate becoming partly viscous above 205°, whereas the symmetrical disulfoxide remains dry and darkens slowly up to 240°.

Both compounds possess a strong peak in the infrared at 8.93 μ. This is the same peak shown by cystine monosulfoxide (Cys(S→O)-S-Cys) (III)[4] and is responsible for the controversial structure assignments. The remaining parts of the spectra are distinctly different (Figure 2).

Bredereck, Wagner, Beck, and Klein[5] showed recently, with several aromatic sulfoxides, that the band at 1050 cm^{-1} (9.54 μ), which was assigned by Sweetman to the sulfoxide group, varies from 1040 cm^{-1} to 1130 cm^{-1} and that various sulfones, disulfones and disulfides exhibit

[1] B. J. Sweetman, Nature *183*, 744 (1959).
[2] T. F. Lavine and G. Toennies, J. biol. Chem. *113*, 576 (1936).
[3] R. Emiliozzi and L. Pichat, Bull. Soc. Chim. France *1959*, 1887.
[4] G. E. Utzinger, Exper. *16*, 136 (1960).
[5] H. Bredereck, A. Wagner, H. Beck, and R. J. Klein, Chem. Ber. *93*, 2736 (1960).

sharp bands in the same region. Methionine sulfoxide exhibits a strong split band with peaks at 1033 cm^{-1} and 1019 cm^{-1}. The assignment of bands to structures including chemical reasoning seems, therefore, the more justified when chemical evidence is available for distinction between various oxidation levels. The IR-spectrum of I is in good agreement with the one given by BREDERECK et al.[5]. The bands at 711 cm^{-1} (14.1 μ) and at 1191 cm^{-1} (8.39 μ) seem to be quite specific for thiolsulfonate. The sulfoxide group has only a weak band at 14.1 μ in the aromatic as well as in the amino acid series. The double peak between 8.2–8.5 μ for all disulfides and their oxidized derivatives studied closes to a single band in the thiolsulfonate.

The unsymmetrical cystine disulfoxide (I) is practically insoluble in water and a lower pH is required to bring it into solution. The symmetrical derivative (II) is a little more soluble than cystine. The two isomers are best separated by alternately dissolving in 0.25 *N* HCl (50 mg in 10 cm^3), whereby I remains undissolved, and precipitating by adding dropwise 8 *N* ammonium hydroxide with cooling and stirring. The pH should never exceed 6 because during the titration both isomers start to decompose at pH's between 6 and 7 (see Figure 1). As reported by EMILIOZZI and PICHAT, the compounds are split to cysteine sulfinic acid.

The fission below pH 7 is of significance in the detection of the disulfoxide in samples of monosulfoxide by titration. For the infusion of the base, a commercial infusion pump[6] was used which delivers the titrant continuously at a chosen speed. An interruption in the continuity of the titration curve (Brown pH Recorder) indicated the presence of a disulfoxide. The symmetrical disulfoxide is particularly characterized by a sharper interruption point (Figure 1).

For a further characterization of the oxidation level of disulfide bonds, the electrolytic hydrogenation in a commercial desalter[7–11] was used as proposed by BENESCH and BENESCH[9] with modification by THOMSON and MARTIN[12]. Further modifications were necessary, however. The electrodes were connected with a recorder which was calibrated for ampères and the rate of escaping hydrogen tracked with the aid of a bubble counter. The cathode space was therefore closed except for the outlet for the bubbles. The mercury pool cathode was stirred by a magnet.

The insoluble disulfoxides were suspended. The end of the reduction or of a reduction step is recognizable by a rise in the bubbles/min count to an almost constant value. In simple cases the hydrogen is given by the coulombs used, as indicated by the recorder, minus the recovered equivalents of hydrogen. The result is less reliable if a large excess of hydrogen is required for the reduction.

The electrolytic hydrogenation allows a sensitive discrimination between cystine monosulfoxide (III), cysteine sulfenyl cysteine sulfinate (II), and cystine thiolsulfonate (I). Unlike the reduction with hydriodic acid which reduced the disulfoxides to cystine[2], the electrolytic hydrogenation could be conducted under mild conditions whereby the reduction steps became visible. Under these conditions, the first step in the reduction of cystine monosulfoxide (III) was the separation of the S-S linkage. Only one equivalent of cysteine was formed.

Cysteinyl cysteine sulfonate (I) also formed one equivalent of cysteine, but more than five times as many coulomb equivalents were needed than for the monosulfoxide. This is partly due to its lower solubility and partly to the steric hindrance of the hexavalent sulfur[1]. The cystine disulfoxide (II) required a larger excess of

Fig. 1. Automatic titration of: (I) *L*-Cystine thiosulfonate 52 mg dissolved in 0.5 ml *N* HCl and diluted to 25 ml with H_2O. (II) *L*-Cystine disulfoxide 64 mg dissolved in 0.5 ml 1 *N* HCl and diluted to 30 ml with H_2O. (III) *L*-Cystine monosulfoxide 56 mg dissolved in 0.5 ml *N* HCl and diluted to 25 ml with H_2O. (I), (II), (III) were titrated with 0.2 *N* NaOH. (IV) *L*-Cystine 64 mg in 0.5 ml *N* HCl and diluted to 30 ml with H_2O titrated with 0.5 *N* NaOH. (I), (II), (IV) show the pH decreasing after the infusion of the titrant was stopped.

[6] Model 600–900, Harvard Apparatus Co., Dover (Mass.).
[7] From Research Specialties Co., Richmond (California).
[8] R. E. BENESCH, H. A. LARDY, and R. BENESCH, J. biol. Chem. *216* 663 (1955).
[9] R. E. BENESCH and R. BENESCH, Biochim. biophys. Acta *23*, 658 (1957).
[10] R. CONSDEN, A. H. GORDON, and A. J. P. MARTIN, Biochem. J. *41*, 590 (1947).
[11] H. MARTIN and H. MCILWAIN, Biochem. J. *71*, 275 (1959).
[12] C. G. THOMSON and H. MARTIN, Biochem. Soc. Symposia No. 17, Gluthathione, p. 17 (Univ. Press, Cambridge 1959).

hydrogen than did the thiosulfonate. Overlapping reduction steps seemed probable. At the end two equivalents of cysteine were formed.

The cysteine solution is then titrated amperometrically in tris buffer (tris-hydroxymethyl-methylamine or 2-amino-2-hydroxymethylpropane 1:3 diol). On addition of cysteine to a buffered solution of silver tris ion $Ag(tris)_2^+$ stirred with a rotating platinum electrode (see below)[13,14], the current drops very sharply and rises again slowly to a constant value, which is, however, much below the start. This drop is assumed to be caused by a catalytic reaction of cysteine with the electrode[15,16]. This drop in the current was utilized, after proper instrumental modifications, as endpoint indication in the quantitative determination of cysteine. Hydrogenolysis followed by amperometric titration was used in the estimation of sulfoxides.

The hydrolytic fission interferes also during electrolytic hydrogenation in aqueous suspension. With a labile oxide the plot of ampere versus time exhibits a steadily increasing conductivity under constant voltage.

In the amperometric titration suggested for biological microanalysis by Benesch and Benesch[9] and Thomson and Martin[12], $AgNO_3$ is added as the titrant to a sample buffered with tris. In this titration the fading of the sharp catalytic response to cysteine overlaps with the rather poor response to added $AgNO_3$. In our estimation we add the cysteine as titrant to a chosen amount of silver tris ion $(Ag(tris)_2^+)$[17]. Every drop of cysteine causes first a catalytic response even in the presence of silver tris ions, which is immediately reversed by reaction of the supposed catalytic intermediate with silver tris ions. When all silver is titrated, the catalytic response remains. This titration therefore uses an unreversed catalytic response as the end point indication of the amperometric titration. The implication is that the other fission product, the very labile cysteine sulfenic acid, is not appreciably reduced under the same conditions and does not cause the catalytic drop used as an end point indication[17].

Zusammenfassung. *L*-Cysteinsäure-*L*-cysteinylester und symmetrisches *L*-Cystindisulfoxyd wurden als zwei isomere Oxydationsprodukte des Cystins isoliert und durch IR-Spektrum und verschiedenes Verhalten bei der elektrolytischen Reduktion charakterisiert. Mit Hilfe gleichmässiger mechanischer Titration wurden die pH-Beständigkeitsbereiche und das kritische pH beginnender Hydrolyse als abrupte Wendung in der Titrationskurve automatisch registriert.

Die katalytische Wechselwirkung des Cysteins an der rotierenden Platinelektrode wurde indirekt als Endpunktindikation der amperometrischen Titration des Cysteins in Tris-Puffer benutzt.

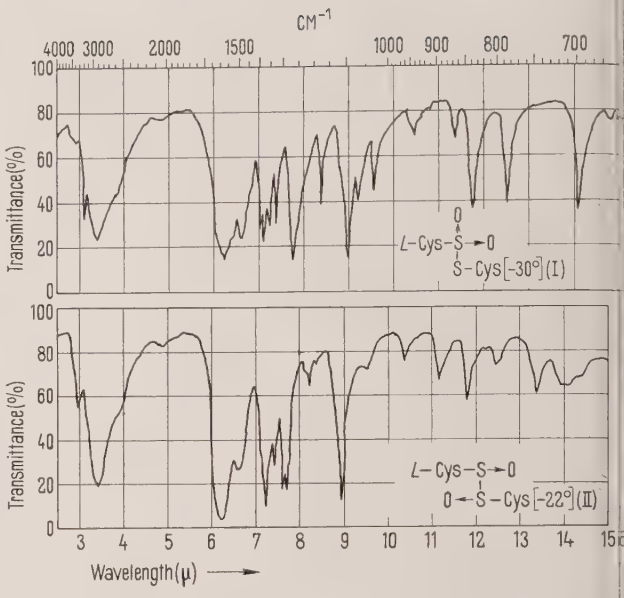


Fig. 2. IR-spectra of *L*-cystine thiolsulfonate (I) and *L*-cystine di sulfoxide (II) in KBr 1:400 measured on a Perkin Elmer Spectro photometer, Model 21, with Slave Recorder.
(I) Synonyms: Cysteinyl cysteine sulfonate, Cysteic acid cysteiny ester, unsymmetrical cystine disulfoxide, Cystinethiolsulfonate
(II) Cysteine sulfenyl cysteine sulfinate, symmetrical cystine disulf oxide.

G. E. Utzinger[18]

School of Pharmacy, University of California Medica Center, San Francisco (Calif.), February 19, 1961.

[13] M. Kolthoff, A. Anastasi, and B. H. Tan, J. Amer. chem. So 80, 3235 (1958).

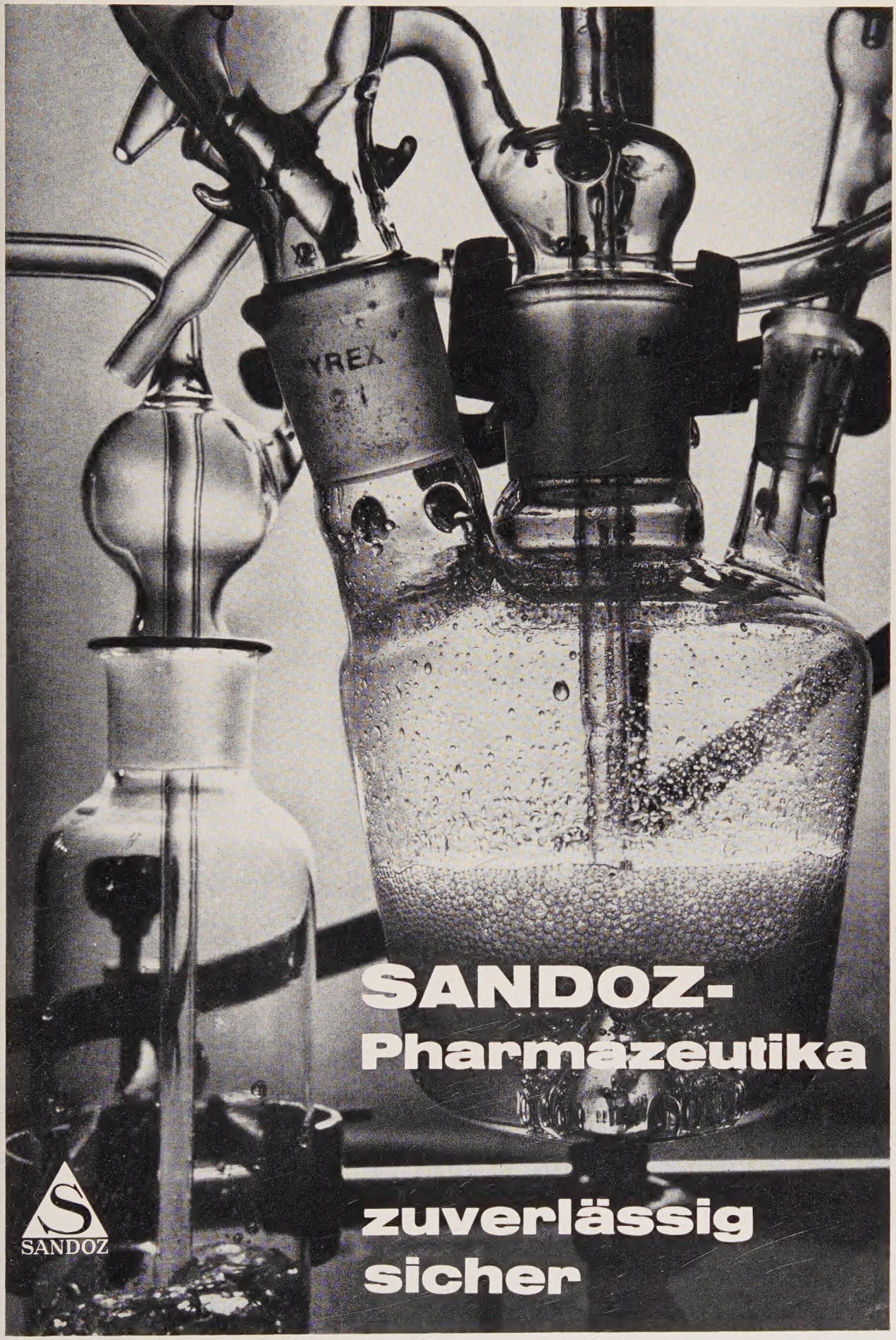
[14] M. Kolthoff and W. E. Harris, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1 161 (1946).

[15] J. Heyrovsky and J. Babicka, Collect. Trav. Chim. Tchecoslov. 2 370 (1930).

[16] In the literature the term catalytic wave of cysteine is mainl assigned to a hydrogen wave which appears in the polarogram o cysteine and of cystine in the presence of Co^{2+} ions (see W. Lamp recht, S. Gudbjarnason, and H. Katzlmeier, Z. physiol. Chem *322*, 52 (1960)).

[17] Various silver salts of cysteine and oxidized fission products ar formed during the amperometric titration of reduced cystin sulfoxides. Their characterization is the topic of pending work.

[18] This work was supported by Cancer Research funds of the Uni versity of California and also in part by funds of AEC contrac No. AT (11-1)-34 Project No. 41. I wish to express my appreciatio to Dean T. C. Daniels and Drs. F. Goyan, L. A. Strait, J. C Craig, E. Jorgensen, and E. Brochmann-Hanssen of the faculty of the School of Pharmacy for support with equipment and counsel.


YREX
SANDOZ-
Pharmazeutika
zuverlässig
sicher
SANDOZ

Aus unserem Verlagsprogramm

KARL R. DIETRICH

Ablaufverwertung und Abwasserreinigung in der biochemischen Industrie

Biochemie und Technologie

XII, 385 Seiten, 134 Abbildungen und Tafeln, Ganzleinen mit Schutzumschlag DM 36,—

Welchen Standpunkt man auch immer zu dem schwierigen Fragenkomplex der Unschädlichmachung der Abläufe der Gärungsindustrien einnimmt, niemand kann sich der Tatsache verschliessen, dass sich eine Lösung der in die inneren Bezirke des öffentlichen Interesses und der Betriebe tief eingreifenden Fragen als dringend notwendig erweist.

HELMUT KRAUCH – WERNER KUNZ

Namenreaktionen der organischen Chemie

Ein Beitrag zur Terminologie der organischen Chemie, Biochemie und theoretischen organischen Chemie

Mit einem Geleitwort von Professor Dr. FRIEDRICH RICHTER, Direktor des Beilstein-Institutes

VIII, 592 Seiten, Ganzleinen mit Schutzumschlag DM 46,—

Das Werk umfasst mit mehr als 500 Reaktionen wesentliche Vorgänge der organischen Chemie, Biochemie und theoretischen organischen Chemie. In alphabetischer Folge geordnet, sind die Reaktionen und ihre Anwendungen ausführlich beschrieben und häufig auch mit modernen Reaktionsmechanismen formuliert.

SIR ROBERT MACINTOSH – WILLIAM W. MUSHIN – H. G. EPSTEIN

Physik für Anaesthesisten

Einschliesslich eines Abschnittes über Explosionen

Erweiterte deutsche Fassung der 2. englischen Auflage, übertragen von H. G. Epstein (Oxford) und H. F. Poppelbaum (Berlin)
XVI, 472 Seiten, mit 379 teilweise farbigen Abbildungen, in Ganzleinen mit Schutzumschlag DM 46,—

Mit einem Geleitwort von Prof. Dr. F. LINDER, Direktor der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik Berlin und einer Einleitung von Prof. Dr. R. FREY, Leiter der Anaesthesieabteilung der Chirurgischen Universitätsklinik Mainz

Seit 15 Jahren haben die englischen Ausgaben des vorliegenden Standardwerkes Generationen von Anästhesisten die physikalischen Grundlagen ihres Fachgebiets übermittelt.
Es gibt zwar vielerlei Bücher über medizinische Physik, doch wird der Anaesthesist in ihnen oft vergeblich Antworten auf praktische Fragen suchen. In der «Physik für Anaesthesisten» haben die Verfasser diese Aufgabe gelöst.

HERMANN STAUDINGER

Arbeitserinnerungen

XII, 335 Seiten, mit 9 Abbildungen, 859 Literaturzitaten, Leinen DM 28,—

An der Schwelle seines 80. Lebensjahres hält Professor Dr. Hermann Staudinger, Nobelpreisträger für Chemie 1953, der Begründer der makromolekularen Chemie, einen Rückblick auf sein wissenschaftlich so reiches Leben. Nach einer Schilderung seines Lebenslaufes gibt er in 859 Zitaten eine vollständige Zusammenstellung der Publikationen von sich und seinen Mitarbeitern.

DR. ALFRED HÜTHIG VERLAG GMBH

Heidelberg Wilckensstrasse 3/5

NATURWISSENSCHAFTLICHE RUNDSCHAU

Schriftleitung: H. Rotta

Berufene Autoren des In- und Auslandes berichten aus ihrem Fachgebiet in verständlicher Form für die Interessenten der Nachbardisziplinen über die Fortschritte der naturwissenschaftlichen und medizinischen Erkenntnisse.

Fortschrittsberichte

erscheinen regelmässig und geben einen Überblick über den augenblicklichen Stand eines Forschungsgebietes. Seit Herbst 1955 wurden 36 Berichte veröffentlicht.

Nobelpreisträger

berichten regelmässig aus ihrem Forschungsgebiet. Seit 1953 erschienen 62 Beiträge.

Kurzberichte aus der Wissenschaft

sind ein wesentlicher Bestandteil eines jeden Heftes. Sie bringen Referate und Nachrichten über interessante Veröffentlichungen, Vorträge und bedeutende Themen in Kurzfassung. Einundzwanzig ständige Mitarbeiter bearbeiten laufend diese Übersicht, die aus den Fachgebieten der Naturwissenschaften und der Medizin berichtet.

Jedes Heft enthält ferner die Spalten:

Photographie und Naturwissenschaften – Wissenschaftliche Gesellschaften und Tagungen – Buchbesprechungen mit der Übersicht Neuerscheinungen – Gedenktage – Hochschulnachrichten.

Monatlich 1 Heft mit über 40 Seiten (DIN A4). Bezugspreis: Vierteljährlich DM 8,40, für Assistenten in nicht voll bezahlter Stellung und Studenten DM 6,80; Einzelheft DM 3,—.

Probeheft kostenlos!

Nobelpreisträger berichten:

Prof. Dr. E. Segrè, Berkeley (USA)
Antimaterie, Heft 7/61

Dr. P. H. Müller, Basel
Zwanzig Jahre wissenschaftlich-synthetische Bearbeitung des Gebietes der synthetischen Insektizide, Heft 6/61

Prof. Dr. H. A. Krebs, Oxford
Biologische Energieumwandlungen, Heft 3/61

Prof. Dr. Walter Rudolf Hess, Zürich
Schlaf, sein Mechanismus und seine physiologische Funktion, Heft 1/61

Prof. Dr. Gerhard Domagk, Wuppertal-Elberfeld
Überwindung der chemotherapeutischen Resistenzerscheinungen bei der Tuberkulose und anderen bakteriellen Infektionen, Heft 11/60

Prof. Dr. Niels Bohr, Kopenhagen
Erkenntnisfragen der Quantenphysik, Heft 7/60

Prof. Dr. Paul Adrian M. Dirac, Cambridge (Grossbritannien)
Gravitationswellen, Heft 5/60

Prof. Dr. George P. Thomson, Cambridge (Grossbritannien)
Thermonukleare Reaktionen, Heft 1/60

Prof. Dr. Cecil F. Powell, Bristol (Grossbritannien)
Die Entstehung der kosmischen Strahlungsteilchen hoher Energien, Heft 12/59

Prof. Dr. Georg v. Hevesy, Stockholm
Radioaktive Markierung von Zellen, Heft 9/59

Prof. Dr. Sir John D. Cockroft, Harwell (Grossbritannien)
Friedliche Nutzung der Atomenergie. Ein Bericht über die Tagung in Genf 1958, Heft 6/59

Prof. Dr. Hans v. Euler, Stockholm
Chemische Struktur und biochemische Wirkung, Heft 5/59

Prof. Dr. Sir Alexander Todd, F.R.S., Cambridge (Grossbritannien)
Einige Betrachtungen aus dem Gebiet der Nucleotid-Coenzym-Synthese, Heft 3/59

Prof. Dr. Richard L. M. Synge, Bucksburn (Schottland)
Die natürlichen Peptide und ihre biologische Bedeutung, Heft 1/59

Prof. Arne Tiselius, Uppsala
Die Nobelstiftung. Ihre Tradition und ihr Wirken, Heft 12/58

Prof. Dr. Frédéric Joliot-Curie, ehem. Paris
Das Zentrum der Grundlagenforschung für Kernphysik, Heft 10/58

Prof. Dr. Hermann J. Muller, Bloomington (USA)
Voraussichtliche Fortschritte der Biologie, Heft 6/58

Dr. Paul Hermann Müller, Basel
Antibiotica und ihre Anwendung in der Landwirtschaft, Heft 5/58

Prof. Dr. Hans Adolf Krebs, Oxford (Grossbritannien)
Die Steuerung von Stoffwechselvorgängen, Heft 3/58

Früher erschienen Beiträge der Nobelpreisträger
Adrian, Born, Butenandt, Cockcroft, Dirac, Dodagk, Einstein, v. Euler-Chelpin, Hahn, Heisenberg, Hess, v. Hevesy, Heymans, Joliot-Curie, Kuhn, v. Laue, Müller, Muller, Pauling, Powell, Schrödinger, Seaborg, Soddy, Stanley, Staudinger, Szent-Györgyi, Virtanen, Waksman, Yukawa

WISSENSCHAFTLICHE VERLAGSGESELLSCHAFT mbH. STUTTGART 1
Postfach 40

Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften

Reihe der experimentellen Biologie – Band 6–11

VERGLEICHENDE PHYSIOLOGIE

in 6 Bänden von

Dr. W. von BUDDENBROCK

Professor emerit. der Zoologie an der Universität Mainz

Band I: Physiologie der Sinnesorgane

504 Seiten mit 256 Figuren. Leinen Fr./DM 46.– (1952)

Inhalt: Einleitung – Lichtsinn – Farbensinn – Tastsinn – Gehörsinn – Vibrationssinn – Wärmesinn – Propriorezeptive Sinneswahrnehmungen – Geruchssinn – Geschmackssinn – Schmerzsinn – Zeitsinn – Stimulierende Wirkung der Sinnesorgane

Band II: Physiologie des Nervensystems

396 Seiten mit 183 Figuren. Leinen Fr./DM 39.– (1953)

Inhalt: Nervensystem der Protozoen – Nervenphysiologie der Metazoen – Einleitung und Allgemeines – Zölenteraten – Echinodermen – Enteropneusten – Niedere Würmer – Anneliden – Arthropoden – Mollusken – Tunikaten und Akranier – Wirbeltiere: Grosshirn – Zwischen- und Mittelhirn – Kleinhirn – Medulla oblongata – Rückenmark

Band III: Ernährung, Wasserhaushalt und Mineralhaushalt der Tiere

678 Seiten mit 241 Tabellen und 205 Figuren
Leinen Fr./DM 68.– (1956)

Inhalt: Ernährung und Verdauung: Allgemeiner Teil, die einzelnen Tierstämme der Wirbellosen (Protozoen, Spongien, Cnidarier, Echinodermen, Würmer, Crustaceen, Arachnoideen, Insekten, Mollusken, Tunicaten und Branchiostoma), Wirbeltiere (Säugetiere, Vögel, Reptilien, Amphibien, Fische). Wasserhaushalt: Allgemeines, einzelne Tierstämme. Mineralhaushalt (Metalle): Alkalimetalle, Kalzium, Magnesium, Zink, Mangan, Eisen, Kupfer, Kobalt, Vanadium, andere Spurenelemente

Band IV: Hormone

492 Seiten mit 115 Figuren und 106 Tabellen
Leinen Fr./DM 52.– (1950)

Inhalt: Allgemeines – Hormone der Wirbeltiere – Schilddrüse – Pankreas – Nebenniere – Nebenschilddrüse – Thymus – Epiphyse – Sexualhormone – Hypophyse – Hormone der wirbellosen Tiere

Band V: Physiologie der Erfolgsorgane

390 Seiten mit 161 Figuren, 110 Tabellen und 1 Farbtafel
Leinen Fr./DM 54.– (1961)

Inhalt: Allgemeine Muskelphysiologie – Die Muskelphysiologie der einzelnen Tierstämme – Physiologie der Geissel- und Cilienbewegung – Die Protoplasmabewegung – Die Physiologie der Chromatophoren (Farbwechsel) – Das tierische Leuchten – Die Produktion der elektrischen Energie

Band VI: Blut, Atmung, Exkretion

In Vorbereitung

«Dass ein einzelner Forscher es wagen kann, das fast unübersehbar angewachsene Fachgebiet zusammenfassend darzustellen, ist an sich eine erstaunliche und wohl einmalig bleibende Leistung. Die Art und Weise aber, wie der Autor diese Aufgabe löst, ist nicht minder bewunderungswürdig.» (E. HADORN, Vierteljahresschrift der Naturforschenden Gesellschaft, Zürich)

«... A large amount of information is presented here in a condensed, organized, yet readable form. In bringing together endocrinological observations from a variety of zoological classes, the book covers a field not at all well represented by anything in English.» (H. N. CATCHPOLE, The Quarterly Review of Biology)

«... Es gibt wohl kaum etwas Gleichwertiges auf dem Gebiet der vergleichenden Physiologie. Es führt in anregendster Weise durch das ganze Gebiet nervöser Leistungen. Auch die Humanphysiologie wird vieles Wertvolle entnehmen können.» (ROTSCHUH, Naturwissenschaftliche Rundschau)

«Im Text bemüht sich v. BUDDENBROCK erfolgreich, klar und auch für den Anfänger verständlich zu schreiben, wodurch naturgemäss viele Probleme didaktisch vereinfacht oder unterdrückt werden, dafür gewinnt der Leser aber einen Überblick über die so verschiedenen Konstruktionsprinzipien der Sinnesorgane in der Tierreihe. Und darin liegt neben den jedem Kapitel beigegebenen Literaturverzeichnissen auch der hohe Wert für den Humanphysiologen.» (RANKE, Berichte über die gesamte Biologie, Abt. B, Physiologie)

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung – Obtainable from your bookseller – Commandes à votre libraire

BIRKHÄUSER VERLAG · BASEL UND STUTTGART